



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOIS PROTOCOLOS VACINAIS PARA PCV2 EM LEITÕES

JOANA FILIPA SIMÕES CEIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira
Martins

Doutor Fernando Jorge Silvano
Boinas

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

Dr. Sérgio José Gaspar Mota de
Gouveia

ORIENTADOR

Dr. Sérgio José Gaspar Mota de Gouveia

CO-ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOIS PROTOCOLOS VACINAIS PARA PCV2 EM LEITÕES

JOANA FILIPA SIMÕES CEIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira
Martins

Doutor Fernando Jorge Silvano
Boinas

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

Dr. Sérgio José Gaspar Mota de
Gouveia

ORIENTADOR

Dr. Sérgio José Gaspar Mota de Gouveia

CO-ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

2012

LISBOA

Aos meus pais

Agradecimentos

Ao Dr. Sérgio Gouveia e ao Dr. Ricardo Mesquita, por me terem recebido na Aligrupo e me deixarem fazer parte do seu dia-a-dia, respondendo a todas as minhas perguntas, transmitindo o seu conhecimento e despertando em mim a vontade de querer continuar ligada à área da Suinicultura. À Eng^a. Catarina Marques, pela simpatia e pela disponibilidade em ensinar-me a trabalhar com o Logiporc.

À Prof. Dr^a. Berta São Braz pela sua sabedoria e ponderação, por conhecer bem os seus alunos e nunca se recusar a ajudá-los, incentivando-os a progredir e a nunca duvidar das suas capacidades. Um exemplo do que é um verdadeiro professor. O meu muito obrigada por TUDO!

Ao Prof. Telmo Nunes pela preciosa ajuda com o tratamento estatístico dos dados e pelas palavras encorajadoras. Ao Prof. Dr. Rui Bessa pela ajuda com a estatística. À Prof. Dr^a Ana Duarte, por aturar os meus “ataques de perfeccionismo”.

À Eng^a. Dora Alves e ao Eng^o. Paulo Lopes, por me terem ensinado todas as pequenas técnicas que não conhecia e tanto nos facilitam a vida; obrigada por me fazerem sentir útil na vossa rotina diária, pelo companheirismo e pela ajuda durante o ensaio.

Ao Dr. Francisco Fagundes da MSD Animal Health, pelo seu entusiasmo e disponibilidade na resolução de todas as questões relacionadas com o trabalho experimental sujeito da presente dissertação.

A todos os médicos veterinários da Cooperl Arc Atlantique, por tão bem me terem acolhido durante a minha estadia. Um obrigada especial ao Dr. Fred Smeets por toda a bibliografia que me forneceu, e à Dr^a. Anne Le Roux, pelos preciosos ensinamentos e por saber o que é estar longe de casa e me integrar na sua família.

Ao Dr. Jean-Noël Sialleli e ao Dr. Rui Perestrelo-Vieira, por me terem proporcionado a oportunidade de estagiar na Cooperl Arc Atlantique. À Graziella Chaudet, por ter tratado de todos os assuntos relativos à minha permanência em França com uma simpatia inesgotável. A todos os técnicos e funcionários da Cooperl Arc Atlantique, pela simpatia e por me integrarem tão bem na “equipa”, fazendo-me sentir imbuída do espírito bretão.

A todos os meus queridos amigos. Obrigada pelos bons momentos vividos e por me terem acompanhado durante estes árduos anos. Ao Pedro, por nunca me deixar desistir e me “obrigar” a descontraír... mesmo contra a minha vontade.

À minha família, sobretudo aos meus pais, a quem dedico este trabalho, que sempre me apoiaram em todas as decisões, me formaram enquanto pessoa e me possibilitaram seguir o meu sonho.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOIS PROTOCOLOS VACINAIS PARA PCV2 EM LEITÕES

Resumo

As vacinas comerciais contra o circovírus porcino tipo 2 (PCV2) reduzem significativamente as perdas associadas a este vírus e melhoram os parâmetros produtivos dos efectivos suínos. A maioria dos produtores vacina os leitões ao desmame mas, sendo este um momento crítico da produção, a alteração do momento de vacinação poderá ser uma estratégia a adoptar quando os indivíduos são expostos a múltiplos agentes perturbadores da homeostasia num curto período de tempo.

Este estudo teve como objectivo a avaliação do momento mais adequado à vacinação de leitões contra o PCV2, considerando parâmetros zootécnicos e imunitários. Foram avaliados as reacções adversas à vacinação, a morbilidade, a mortalidade, o ganho médio diário (GMD) e o peso dos animais. Os 453 leitões de dois desmames consecutivos foram distribuídos por dois grupos de tratamento. Efectuou-se a administração intramuscular de uma dose de 2 ml de Porcilis® PCV e de uma dose de 2 ml de M+PAC® em leitões 5 dias antes do desmame (grupo A) ou 5 dias após o desmame (grupo B). O peso corporal individual dos animais foi registado no dia 0 do ensaio e 45 dias depois. Realizaram-se colheitas de sangue em leitões de cada grupo às 12, 16 e 22 semanas de idade para detecção e quantificação de anticorpos anti-PCV2 e anticorpos baculomarcadores, de modo a aferir sobre a qualidade da imunização com a vacina de subunidades contendo a proteína da cápside de PCV2a expressa num sistema de baculovírus (Porcilis® PCV).

A vacinação induziu hipertermia e diminuição da actividade e da ingestão. O grupo A exibiu morbilidade 4 vezes superior à do grupo B ($P < 0,0001$), mas a mortalidade não diferiu entre grupos ($P = 0,578$). O peso final e o GMD diferiram significativamente entre os dois grupos ($P = 0,009$), tendo-se observado um melhor desempenho produtivo dos leitões do grupo A. Os resultados de Bacucheck® ELISA e de Synbiotics Serelisa® indicaram que Porcilis® PCV foi correctamente utilizada, não existindo diferenças em termos imunitários entre grupos.

Sendo o crescimento na primeira semana após o desmame um factor de risco para o subsequente desempenho na recria, especulou-se que o custo metabólico e a perturbação derivados da vacinação 5 dias após o desmame nos leitões do grupo B, exerceram efeitos a mais longo prazo, o que justificou o seu pior desempenho produtivo. Deste modo, o efeito negativo da vacinação no desempenho da recria não pode ser menosprezado, devendo ser considerado aquando da concepção de estratégias vacinais.

Palavras-chave: PCV2, doença sistémica do PCV2, vacinação, imunidade, crescimento

EVALUATION OF THE EFFECT OF TWO VACCINATION PROTOCOLS FOR PCV2 IN PIGLETS

Abstract

Commercial porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines significantly reduce losses associated to this virus and improve productive performance in swine herds. Most producers vaccinate piglets at weaning but being this one of the most critical moments of production, altering vaccination timing may be a strategy to adopt when individuals are exposed to multiple disturbing factors in a short period of time.

The aim of this study was to evaluate the most adequate moment for piglet's vaccination against PCV2 considering productive performance and immune parameters. Adverse reactions to vaccination, morbidity, mortality, average daily gain (ADG) and weight were assessed. 453 piglets of two consecutive weanings were distributed between two treatment groups. An intramuscular injection of a 2 ml dose of Porcilis® PCV and a 2 ml dose of M+PAC® was performed in piglets 5 days before weaning (group A) or 5 days after weaning (group B). Individual body weights of all animals were measured the day 0 of trial and 45 days later. Blood samples were taken from piglets of both groups at 12, 16 and 22 weeks of age for detection and quantification of anti-PCV2 antibodies and baculomarkers to evaluate vaccination quality with the subunit vaccine based on the PCV2a capsid protein expressed in baculovirus system (Porcilis® PCV).

Vaccination induced hyperthermia, prostration and anorexia. Group A exhibited 4 times more morbidity than group B ($P < 0.0001$) but mortality did not differ between groups ($P = 0.578$). Final weight and ADG differed significantly between groups ($P = 0.009$) with group A piglets having an increased performance. Bacucheck® ELISA and Synbiotics Serelisa® results indicated that Porcilis® PCV had been used correctly with no immune differences between groups.

Being growth performance in the first week after weaning a risk factor for subsequent nursery performance, it is speculated that disturbance and metabolic cost of vaccination 5 days after weaning in group B piglets may have had greater potential for longer term effects, which explained their worst growth performance. Thus, negative effects of vaccination on nursery growth performance should not be underestimated when conceiving vaccine strategies.

Keywords: PCV2, PCV2 systemic disease, vaccination, immunity, growth

Índice Geral

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xiii
Capítulo I. Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio curricular	1
Capítulo II. Revisão Bibliográfica	5
1. Introdução	5
2. Infecção pelo Circovírus Porcino Tipo 2 e a Doença Sistémica do Circovírus Porcino Tipo 2	5
2.1. Importância económica das PCVD	6
2.2. Importância das PCVD na Segurança Alimentar e na Saúde Pública	10
2.3. Circovírus Porcino Tipo 2 (PCV2)	11
2.3.1. História do PCV2	11
2.3.2. Taxonomia, morfologia e organização genómica	12
2.3.3. Variação genética	13
2.4. Epidemiologia da infecção por PCV2 e da PCV2-SD	14
2.4.1. Distribuição geográfica e temporal	14
2.4.2. Susceptibilidade do hospedeiro	16
2.4.3. Vias de transmissão	16
2.5. Patogénese	19
2.5.1. Células-alvo	20
2.5.2. Disseminação do vírus e dinâmica da infecção	21
2.5.3. Immunopatogénese da infecção por PCV2	24
2.6. Factores que influenciam a progressão da infecção por PCV2 para PCV2-SD	29
2.6.1. Factores hospedeiro-dependentes	29
2.6.1.1. Género, idade e genética	29
2.6.1.2. Resposta imunitária após infecção	30
2.6.2. Estatuto imunitário e infeccioso da porca	33
2.6.3. Momento da infecção	34
2.6.4. Factores vírus-dependentes	34
2.6.5. Co-infecções e imunomodulação	35
2.6.6. Maneio	38
2.7. Quadro clínico e lesional	38
2.8. Diagnóstico	41
2.8.1. Diagnóstico individual e de exploração	41
2.8.2. Métodos de detecção de ácido nucleico e antígeno virais e anticorpos anti-PCV2	42
2.9. Prevenção e controlo	44
2.9.1. Vacinação	46
2.9.1.1. Vacinas comerciais contra o PCV2 disponíveis no mercado	46
2.9.1.2. Eficácia vacinal	48
2.9.1.3. Estratégias vacinais	50
2.9.1.3.1. Efeito da vacinação contra o PCV2 na transmissão vertical	52
2.9.1.3.2. Vacinação das reprodutoras	52
2.9.1.3.3. Vacinação dos leitões	55

2.9.1.4. A importância da vacinação na redução da virémia	59
2.9.1.5. Imunidade após vacinação	61
2.9.1.6. Novas perspectivas para produtos vacinais	63
Capítulo III. Trabalho Experimental	68
1. Objectivos	68
2. Materiais e Métodos	69
2.1. Exploração, animais e alojamento	69
2.2. Protocolo experimental	71
2.3. Monitorização dos parâmetros clínicos e colheita de amostras	73
2.4. Determinação do título de anticorpos anti-PCV2 e de baculomarcadores	74
2.5. Análise estatística.....	75
3. Resultados	76
3.1. Reacções adversas à vacinação	76
3.2. Morbilidade e mortalidade entre grupos experimentais.....	76
3.3. Comparação dos pesos iniciais e finais e do ganho médio diário entre grupos	78
3.4. Resposta serológica após vacinação contra o PCV2.....	79
4. Discussão	82
5. Conclusão e considerações finais	94
Bibliografia	97
Anexos.....	114

Índice de Figuras

Figura 1. Recolha de sémen em varrasco e seu posterior processamento em laboratório.....	2
Figura 2. Medição dos níveis de hemoglobina em porcas com recurso ao equipamento HemoCue®	3
Figura 3. Suíno de engorda com massa evidente na região abdominal, a qual viria a revelar-se uma torção intestinal	4
Figura 4. O PCV2 manifesta-se geralmente de forma subclínica, menos visível que a forma clínica.....	9
Figura 5. Ocorrência de PCV2-SD no mundo e ano dos primeiros acontecimentos.....	15
Figura 6. Invasão epitelial e disseminação linfática da infecção.....	22
Figura 7. Imunopatogénese da infecção pelo PCV2	28
Figura 8. Perfil de anticorpos de origem materna e induzidos pela vacinação e janela de vacinação para o PCV2.....	57
Figura 9. Relação entre a virémia por PCV2 e o GMD	60
Figura 10. Expressão do antígeno ORF2 do PCV2 utilizando um sistema de baculovírus como vector	65
Figura 11. Identificação de animais vacinados e não vacinados com Porcilis® PCV	67
Figura 12. Exploração em estudo	69
Figura 13. Instalações de recria	70
Figura 14. Sistemas de alimentação na recria	70
Figura 15. Pesagem individual.....	71
Figura 16. Colocação dos brincos.....	71
Figura 17. Vacinação com Porcilis® PCV e M+PAC® na maternidade e na recria	72
Figura 18. Medição da temperatura rectal.....	73
Figura 19. Cronograma dos acontecimentos decorridos no estudo.....	74
Figura 20. Reacções adversas à vacinação.....	76
Figura 21. Análise da taxa de mortalidade na recria	77
Figura 22. Comparação do título de anticorpos anti-PCV2 entre os grupos experimentais A e B (22 semanas de idade)	80
Figura 23. Comportamento agonístico e lesões derivadas de lutas observados na recria durante o ensaio experimental	83
Figura 24. Curva de crescimento para suínos de recria e engorda	87

Índice de Tabelas

Tabela 1. Mortalidade, desenvolvimento do peso e índice de conversão nos períodos pré-PCV2-SD, PCV2-SD e pós-PCV2-SD.....	7
Tabela 2. Vendas, custos e resultado económico (€/suíno) nos períodos pré-PCV2-SD, PCV2-SD e pós-PCV2-SD	8
Tabela 3. Peso ao abate, ganho médio diário e índice de conversão (média \pm desvio-padrão) numa exploração afectada por um surto de PCV2-SD	8
Tabela 4. Agentes de co-infecção reportados em casos naturais de PCV2-SD	36
Tabela 5. Valores de IgG e IgM para determinação do momento de infecção pelo PCV2...	43
Tabela 6. Vacinas comerciais contra PCV2	47
Tabela 7. Comparação das <i>performances</i> reprodutivas em 277 explorações antes e após o uso de uma vacina comercial.....	55
Tabela 8. Dados descritivos dos grupos em estudo	72
Tabela 9. Avaliação da temperatura rectal em animais vacinados e não vacinados	76
Tabela 10. Entidades clínicas que exigiram tratamento durante a permanência dos animais na recria.....	77
Tabela 11. Peso final à saída da recria e GMD para o intervalo dia de inclusão-saída da recria (global).....	78
Tabela 12. Peso final à saída da recria e GMD para o intervalo dia de inclusão-saída da recria nos animais do grupo experimental A	78
Tabela 13. Peso final à saída da recria e GMD para o intervalo dia de inclusão-saída da recria nos animais do segundo desmame.....	79
Tabela 14. Resposta serológica pós-vacinação (12 semanas de idade)	79
Tabela 15. Resposta serológica pós-vacinação (16 semanas de idade)	80
Tabela 16. Estatística descritiva: comparação do título de anticorpos anti-PCV2 (UE) entre os grupos experimentais A e B (22 semanas de idade)	81

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

%	Porcentagem
€	Euro
®	Marca registada
™	<i>Trade mark</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMCF-II	Factores quimiotácticos dos neutrófilos derivados dos macrófagos alveolares
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
CD	Célula dendrítica
CpG-ODN	CpG-oligonucleótidos
d.p.	Desvio-padrão
dsADN	ADN de cadeia dupla
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
<i>fr</i>	Frequência relativa
g	Grama
G-CSF	Factor estimulador de colónias de granulócitos
GMD	Ganho médio diário
IA	Inseminação artificial
IC	Índice de conversão
IFA	Imunofluorescência indirecta
IFN	Interferão
IFN- γ -SC	Células secretoras de IFN- γ
IHC	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IPMA	Imunoperoxidase em monocamada
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacárido
MA	Macrófagos alveolares
mCD	Células dendríticas mielóides
MDA	Anticorpos de origem materna
Mh	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MCP	Proteína quimiotáctica dos monócitos
MIP	Proteína inflamatória dos macrófagos
ml	Mililitro
NA	Anticorpos neutralizantes
NIPCs	Células produtoras de interferão
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanómetro
ORF	Grelha de leitura aberta
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
pCD	Células dendríticas plasmocitóides
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCV	Circovírus porcino
PCV1	Circovírus porcino tipo 1
PCV2	Circovírus porcino tipo 2
PCV2-SD	Doença sistémica do PCV2
PCVAD	Doenças associadas ao circovírus porcino
PCVD	Doenças do circovírus porcino
p.i.	Pós-inoculação
PDNS	Síndrome de nefropatia e dermatite porcina
PMWS	Síndrome multissistémica de emagrecimento pós-desmame
PNP	Pneumonia necrosante proliferativa
PPV	Parvovírus porcino
PRDC	Doenças do complexo respiratório porcino
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PRRSV	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina
SIV	Vírus da gripe suína
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
ssADN	ADN de cadeia simples
TA	Anticorpos totais
TNF- α	Factor de necrose tumoral α
UE	União Europeia
VDA	Vírus da doença de Aujeszky

Capítulo I. Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio curricular

Após a conclusão da componente lectiva do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, é imperativa a realização de um estágio curricular que permita ao aluno a aplicação dos conceitos aprendidos à prática profissional diária.

O estágio curricular da estudante foi desenvolvido na área de suinicultura, nomeadamente na sua vertente de produção intensiva, tendo decorrido em dois locais distintos: nas várias explorações suínicas do agrupamento de produtores Aligrupo, CRL; e na cooperativa agrícola Cooperl Arc Atlantique.

1. Aligrupo - Agrupamento de Produtores de Suínos, CRL

A Aligrupo tem a sua sede no Passil, concelho de Alcochete, distrito de Setúbal, constituindo-se como agrupamento de produtores de suínos. O grupo detém várias empresas, entre elas a Alirações - Rações para Animais, S.A., que produz alimentos composto para animais (cerca de 70 a 80% para auto-consumo), e a SMUR - Sociedade de Multiplicação e Recria Animal, S.A., cujos principais objectivos são o controlo da genética (através da produção de sémen e reprodutoras para todo o grupo de explorações associadas) e a produção de animais para abate em explorações próprias, arrendadas e integradas.

O apoio técnico às explorações do grupo é assegurado por dois médicos veterinários, o Dr. Sérgio Gouveia e o Dr. Ricardo Mesquita, que a estudante teve oportunidade de acompanhar durante o período de estágio, que decorreu entre 5 de Setembro de 2011 e 20 de Janeiro de 2012. De entre as várias actividades desenvolvidas, destacam-se a realização de diagnóstico de gestação com recurso a ecógrafo portátil, a colheita de sangue no âmbito do Plano de Controlo e Erradicação da Doença de Aujeszky, a realização de necrópsias para diagnóstico de variadas afecções, reavaliação e/ou instituição de planos vacinais e de tratamento e alteração de instalações e/ou manejo sempre que se julgou conveniente. De forma a proceder ao diagnóstico de certas afecções, bem como avaliar a sua evolução após instituição de terapêutica, foram acompanhados alguns abates de animais pertencentes às explorações acompanhadas.

Durante os meses de Outubro e Novembro de 2011, sob a supervisão dos engenheiros de produção animal Dora Alves e Paulo Lopes, a estudante realizou uma componente maioritariamente relacionada com o manejo da exploração suínica, a qual teve lugar numa das explorações do grupo, situada na Azambuja. Durante este período, participou em todas as tarefas do quotidiano da exploração, nomeadamente vacinação, movimentação de animais, diagnóstico de cios e inseminação artificial, assistência a partos (vigilância, secagem dos leitões, tracção manual de leitões), manejo de ninhadas (adopção, desparasitação, administração de ferro intramuscular, limagem de dentes, corte de caudas e tatuagem do pavilhão auricular), preparação e distribuição de alimento e administração de

medicamentos. Neste local foi também realizado o ensaio de campo objecto da presente dissertação. A estudante teve igualmente a oportunidade de permanecer algumas horas no centro de recolha, análise e processamento de sémen, no Cartaxo. Para além de recolhas em varrascos (Figura 1), preparou as doses que são distribuídas pelas diversas explorações do grupo e analisou laboratorialmente várias amostras (avaliação da vitalidade e viabilidade dos espermatozóides e análise físico-química e bacteriológica do sémen).

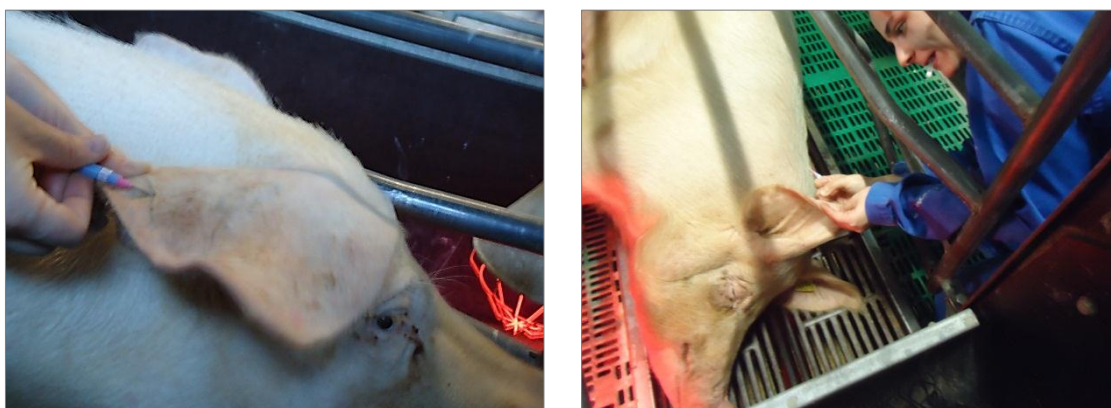
Figura 1. Recolha de sémen em varrasco e seu posterior processamento em laboratório



2. Cooperl Arc Atlantique

A sede da cooperativa agrícola Cooperl Arc Atlantique encontra-se situada na cidade de Lamballe, departamento de Côtes-d'Armor, Bretanha, no noroeste de França. O grupo é constituído por mais de 2700 aderentes, dos quais cerca de 2200 são produtores especializados que gerem explorações de dimensão familiar (em média, 200 porcas em regime de ciclo fechado) e produzem anualmente cerca de 6 milhões de suínos. De entre os mais de 4000 assalariados destacam-se equipas especializadas formadas por técnicos de genética, de planeamento e desenho de instalações, de ambiente, de gestão económica e de exploração, que prestam serviços às explorações associadas. A equipa médico-veterinária, constituída por vinte e dois profissionais, presta os seus serviços de forma independente, aconselhando e intervindo sempre que necessário. Durante o período de 1 de Fevereiro a 30 de Março de 2012, a estudante teve a oportunidade de acompanhar alguns destes profissionais nas suas visitas anuais de acompanhamento para preenchimento obrigatório do relatório sanitário e realização de eventuais alterações ao nível do maneio, instalações e/ou planos vacinais ou de tratamento, bem como em visitas de carácter urgente nas quais foram realizadas, entre outros, necrópsias, colheitas de sangue para despiste e/ou detecção de afecções, zaragatoas nasais e rectais e medição dos níveis de hemoglobina em porcas e leitões (Figura 2).

Figura 2. Medição dos níveis de hemoglobina em porcas com recurso ao equipamento HemoCue®



A estudante também acompanhou os médicos veterinários em acções de demonstração de práticas correctas de vacinação, aplicação de medicamentos e resolução cirúrgica de hérnias escrotales. Foram também efectadas visitas conjuntas com os técnicos de exploração, nas quais se realizaram acções correctivas visando adequar temperatura e ventilação às instalações em questão, análise dos resultados produtivos e medição da espessura da gordura dorsal de porcas com recurso a sonda apropriada.

O grupo conta também com três unidades de produção de alimento composto para animais (suínos, ruminantes e aves), as quais produzem cerca de 1650000 toneladas anuais de alimento, duas das quais a estudante visitou com o médico veterinário responsável. Foram realizadas regularmente visitas a dois dos seis matadouros detidos pela empresa, nos quais a estudante efectuou a notação de lobos pulmonares em conjunto com o técnico responsável. Proporcionou-se igualmente a visita a uma unidade de valorização dos resíduos produzidos durante o abate dos animais, os quais são utilizados na produção de energia térmica e de co-produtos posteriormente reincorporados no alimento.

O grupo Cooperl Arc Atlantique é também detentor da empresa e da marca Farm'apro, responsável pela pesquisa e distribuição de produtos químicos e biológicos utilizados nos processos de lavagem e desinfecção de instalações, na nutrição (complexos oligo-vitâmicos e reguladores da flora) e na reprodução. A estudante acompanhou os seus técnicos-comerciais no processo de angariação de novos clientes, realização de ensaios com os produtos comercializados e venda dos mesmos, recolha de amostras de água e alimento para posterior análise e realização de provas de contacto de modo a aferir sobre a eficácia dos protocolos de lavagem e desinfecção instaurados.

3. LDA22 - Laboratoire de Développement et d'Analyses

Durante a realização do estágio curricular em França, proporcionou-se a oportunidade de realizar um pequeno estágio de 3 dias neste laboratório de referência francês, situado em Ploufragan. Assim sendo, a estudante acompanhou maioritariamente o serviço de anatomia

patológica, nomeadamente a realização de necrópsias em suínos (Figura 3), bovinos e aves, identificação macroscópica de lesões e colheita de amostras para análises ulteriores, mas também os serviços de histopatologia, bacteriologia, imunologia e produção de autovacinas.

Figura 3. Suíno de engorda com massa evidente na região abdominal, a qual viria a revelar-se uma torção intestinal



Consciente da importância da realização do estágio no desenvolvimento de novas competências a nível académico, profissional e pessoal, bem como na colocação em prática dos conhecimentos adquiridos durante a sua formação, a estudante decidiu realizar esta componente em vários locais distintos. Assim, por ter sido desenvolvido em dois contextos económicos e tecnicamente diferentes, o estágio permitiu o contacto com diversas realidades da produção suína. Em Portugal, onde os recursos são escassos e a conjuntura económica mais desfavorável, a estudante presenciou situações com as quais teve de lidar empregando poucos meios complementares de diagnóstico, recorrendo, muitas vezes, ao chamado “diagnóstico terapêutico”. Em França, utilizando mais frequentemente técnicas de diagnóstico, a estudante pode centrar-se mais especificamente sobre outras questões pertinentes, nomeadamente questões mais técnicas, relacionadas com o manejo e as instalações.

Por ter integrado contacto várias equipas multidisciplinares, este estágio revelou-se extremamente enriquecedor, permitindo à estudante adquirir múltiplas valências, essenciais à futura prática profissional como responsável sanitária de explorações suínas.

1. Introdução

O circovírus porcino tipo 2 (*porcine circovirus type 2* - PCV2) é o agente causal primário de várias síndromes colectivamente designadas doenças do circovírus porcino (*porcine circovirus diseases* - PCVD), na Europa; ou doenças associadas ao circovírus porcino (*porcine circovirus associated diseases* - PCVAD), nos Estados Unidos da América (EUA). A nível mundial, este vírus é responsável por enormes prejuízos económicos na indústria produtora de suínos, sobretudo por não existir uma terapêutica eficaz para os animais atingidos pelo agente. Neste sentido, a prevenção assume-se como um ponto fundamental na luta contra o PCV2, da qual fazem parte a implementação de regras de manejo que limitem a transmissão viral e a correcta vacinação dos efectivos.

Assim, na presente dissertação pretende-se, para além da caracterização do agente etiológico e das suas características epidemiológicas e patológicas, a abordagem das várias vertentes preventivas, das quais se destaca a vacinação.

Após a revisão bibliográfica sobre os complexos conceitos associados à infecção pelo PCV2 e à PCV2-SD (*PCV2 systemic disease*), e à sua prevenção, é apresentado um trabalho experimental realizado em condições de campo que visa, primordialmente, a avaliação do momento mais adequado para a imunização de leitões contra o PCV2 considerando parâmetros zootécnicos e imunitários. Sendo a vacinação contra o PCV2 uma prática corrente nas actuais condições de suinicultura intensiva, inclusivamente em Portugal, este estudo ambiciona trazer novos dados relativamente a protocolos vacinais alternativos em leitões.

2. Infecção pelo Circovírus Porcino Tipo 2 e a Doença Sistémica do Circovírus Porcino Tipo 2

O alcance clínico e patológico da infecção pelo PCV2 tem-se expandido nos últimos 20 anos, atribuindo-se ao vírus um papel causal num elevado número de síndromes clínicas. A mais descrita é a síndrome multissistémica de emagrecimento pós-desmame (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* - PMWS), embora o PCV2 também possa desempenhar um papel na ocorrência de problemas reprodutivos, doenças do complexo respiratório porcino (*porcine respiratory disease complex* - PRDC), enterite, síndrome de dermatite e nefropatia porcina (*porcine dermatitis and nephropathy syndrome* - PDNS) e pneumonia necrosante proliferativa (*proliferative necrotizing pneumonia* - PNP) (Chae, 2004; Harding, 2004; Opriessnig, Meng & Halbur, 2007; Segalés, 2012). Também o tremor congénito tipo A2 foi inicialmente associado à infecção pelo PCV2, mas estudos subsequentes sugeriram não existir associação entre o vírus e tal condição (Kennedy et al., 2003). Uma manifestação mais subtil da infecção por PCV2 consiste num desempenho produtivo pouco optimizado em efectivos aparentemente saudáveis (Laza, López, Bollo, Menjon & Jiménez, 2011; Venegas-

Vargas, Bates, Morrison, Villani & Straw, 2011). Muito recentemente, foi descrita uma nova síndrome denominada edema pulmonar agudo (*acute pulmonary edema* - APE), que ocorre sobretudo em suínos da recria e da fase inicial da engorda. Os sinais clínicos incluem, sem que os animais apresentem indícios precoces da doença, um início rápido de dispneia seguida de morte quase imediata. O único agente infeccioso consistentemente identificado nos tecidos analisados foi o PCV2 (Cino-Ozuna et al., 2011). Contudo, esta nova condição potencial ligada ao PCV2 foi descrita apenas uma vez, sendo ainda precipitado estabelecer uma patogénese e retirar conclusões sobre o envolvimento do vírus.

Segundo alguns autores, só é possível o estabelecimento de uma inequívoca relação causal entre o PCV2 e o desenvolvimento de doença em casos de PMWS e problemas reprodutivos, sendo ainda a associação do vírus com as outras condições alvo de controvérsia (Fort, Olvera, Sibila, Segalés & Mateu, 2007; Segalés et al., 2007). De todas as PCVD, e apesar de o recente desenvolvimento de vacinas ter diminuído o impacto negativo do PCV2 nas populações suínas (Rose, Opriessnig, Grasland & Jestin, 2012), a PMWS, para além da manifestação clínica mais comum, é considerada a principal causadora de perdas importantes no sector da produção suína (López-Soria, Grau-Roma & Segalés, 2008). Recentemente, Joaquim Segalés, um conceituado investigador na área do PCV2, propôs uma terminologia alternativa para algumas PCVD. Segundo ele, a PMWS, que tem denominações como circovirose suína (López-Soria et al., 2008; Lopes, 2009) e infecção sistémica associada ao PCV2 (Opriessnig et al., 2007), deverá adoptar a denominação doença sistémica do PCV2 (PCV2-SD) (Segalés, 2012). Seguindo as actuais tendências em matéria de investigação, e dadas algumas alterações registadas ao nível da idade de manifestação da doença clínica comparativamente aos primórdios da afecção, a autora da presente dissertação decidiu utilizar a terminologia proposta por Segalés (2012).

A infecção por PCV2 ocorre em todos os países produtores de suínos do mundo e o número de casos de PCVD tem aumentado nos últimos anos, o que pode ser um reflexo de uma consciencialização generalizada destas doenças, do aumento da submissão de amostras ou do aumento da sua incidência nas regiões consideradas (Opriessnig et al., 2007). Em Portugal, a percentagem de amostras positivas para PCV2 aumentou exponencialmente a partir de 2005, provavelmente reflectindo uma maior precisão na identificação clínica das infecções por este agente viral (Henriques et al., 2011).

2.1. Importância económica das PCVD

As PCVD e, mais especificamente, a PCV2-SD, são actualmente consideradas doenças emergentes à escala global, tratando-se das principais condições que afectam negativamente a economia da indústria produtora de suínos. As PCVD acarretam avultados prejuízos nas explorações afectadas, pois estão directamente relacionadas com o aumento da mortalidade e da morbilidade na recria e na engorda, a diminuição do GMD, o aumento

dos custos de doenças secundárias a situações de imunossupressão e o aparecimento de resistências a antibióticos.

As perdas financeiras anuais encontram-se estimadas em cerca de 600 milhões de euros na União Europeia (UE) (Kuehn, Sondermeijer, Eggen, Fiebig & Von Rueden, 2011; Segalés et al. 2007) e 200 milhões de dólares no Canadá (Harding, 2008). Dados do Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA) estabelecem os custos anuais da doença em perto dos 30 milhões de libras no Reino Unido. Nos EUA, a enfermidade tem custado aos produtores uma média de 3 a 4 dólares por animal sendo que, em alguns casos, estas perdas podem ascender aos 20 dólares (Gillespie, Opriessnig, Meng, Pelzer & Buechner-Maxwell, 2009). No entanto, a real dimensão económica da doença permanece ainda sob escrutínio, dada a sua complexa componente multifactorial. Hardge, Gaumann, Hasberg e Lange (2003) analisaram o impacte económico de um surto de PCV2-SD na recria tendo em conta os efeitos económicos associados à redução do crescimento, ao aumento da taxa de refugo, às perdas derivadas da doença ou de infecções secundárias (*Escherichia coli*, *Streptococcus suis*) e ao custo das intervenções veterinárias (medicação, exames complementares de diagnóstico e custo do trabalho). Após um longo período de produção estável, cerca de 3 semanas após a sua transferência da maternidade para a recria, os leitões alvo do estudo começaram a evidenciar sinais clínicos típicos de PCV2-SD - aumento súbito da mortalidade (até 20%), emagrecimento, palidez e dispneia; o diagnóstico foi devidamente confirmado através de análises anatomopatológicas e detecção de PCV2 em amostras de pulmão e soro sanguíneo por PCR (*polymerase chain reaction*). Os dados relativos à mortalidade, crescimento e índice de conversão nos períodos pré-PCV2-SD, PCV2-SD e pós-PCV2-SD encontram-se sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Mortalidade, desenvolvimento do peso e índice de conversão nos períodos pré-PCV2-SD, PCV2-SD e pós-PCV2-SD (Adaptado de Hardge et al., 2003)

		Pré-PCV2-SD	PCV2-SD	Pós-PCV2-SD
Número	(n)	12535	7337	17628
Mortalidade	%	3,7 ^a	9,4 ^b	4,0 ^a
Ganho médio diário	(g)	367 ^{ab}	354 ^b	376 ^a
Índice de conversão	(kg/kg)	1,57 ^a	1,63 ^b	1,53 ^a

Os valores com diferentes sobrescritos são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

A mortalidade média aumentou significativamente entre o período pré-PCV2-SD e o período PCV2-SD. Dado o emagrecimento tipicamente observado, o GMD foi menor no período PCV2-SD, verificando-se simultaneamente um aumento no índice de conversão (IC) (mais 60 gramas de alimento necessário por quilograma de peso ganho). Consequentemente, não só o rendimento produtivo foi afectado, como também a variabilidade de grupo para grupo se acentuou. Os autores verificaram que durante a fase clínica aumentaram não só as

perdas directas devido à PCV2-SD, mas também as perdas relacionadas com doenças secundárias (mais do triplo do valor do período pré-PCV2-SD).

A comparação entre o preço de venda dos animais e o preço associado à sua produção revelou um resultado económico 34 a 35% inferior no período PCV2-SD quando comparado com os períodos pré e pós-PCV2-SD, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Vendas, custos e resultado económico (€/suíno) nos períodos pré-PCV2-SD, PCV2-SD e pós-PCV2-SD (Adaptado de Hardge et al., 2003)

		Pré-PCV2-SD	PCV2-SD	Pós-PCV2-SD
Vendas	€/suíno*	57,9	56,2	57,6
Custos com leitões	€/suíno*	34,2	36,3	34,4
Custos com alimento	€/suíno *	8,99	8,89	8,76
Custos veterinários	€/suíno *	3,18	3,53	2,76
Resultado económico				
Margem bruta	€/suíno *	11,56	7,62	11,68

* por suíno vendido

No período PCV2-SD os custos com as intervenções veterinárias aumentaram entre 0,35 e 0,77 € por animal comparativamente aos períodos pré e pós-PCV2-SD, respectivamente. A maior percentagem destes custos foi atribuída à instituição de antibióterapia, necessária ao combate das infecções secundárias manifestadas pelos animais.

A mesma tendência é igualmente observada na engorda, podendo o impacte financeiro variar entre explorações ou mesmo entre lotes de animais. Um estudo canadiano apurou uma perda estimada de cerca de 30000 dólares por cada lote de 1000 suínos de engorda atingido por PCV2-SD (Leblanc, Morin & Messier, 2005).

Pejsak, Podgórska, Truszczyński, Karbowski e Stadejek (2010) estudaram o desempenho produtivo global de uma exploração de ciclo fechado afectada por um surto agudo de PCV2-SD. Este acontecimento causou um aumento significativo da mortalidade total, bem como um decréscimo do GMD e um aumento do IC (Tabela 3).

Tabela 3. Peso ao abate, ganho médio diário e índice de conversão (média ± desvio-padrão) numa exploração afectada por um surto de PCV2-SD (Adaptado de Pejsak et al., 2010)

	GMD	IC (kg/kg)	Mortalidade total (%)	Peso ao abate (kg)
Antes do surto de PCV2-SD	611 ± 9,09*	3,1 ± 0,08*	17,29 ± 1,48*	94,8 ± 1,56
Durante o surto de PCV2-SD	568,5 ± 7,18*	3,3 ± 0,06*	28,76 ± 4,89*	92,5 ± 1,16

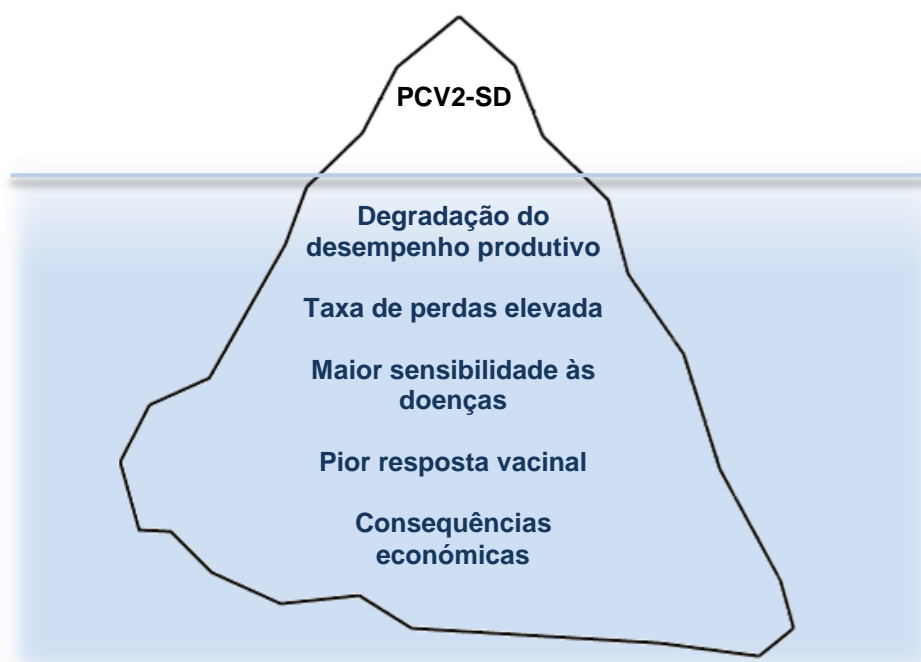
* $p \leq 0,05$

A alimentação é a principal despesa fixa das explorações suínas, representando cerca de 80% dos custos de produção globais (Merial, 2006). A mortalidade registada afecta as

margens de lucro dos produtores, não só porque estes dispõem de menor quantidade de animais disponíveis para venda como também porque, previamente à sua morte, ocorre um consumo de alimento que não é valorizado. Nas explorações onde as PCVD são subestimadas, as unidades produtoras de alimento composto são frequentemente questionadas sobre a qualidade do mesmo, o que se reflecte numa dificuldade adicional no processo de pagamento por parte dos produtores, gerando-se situações de tensão entre os intervenientes.

Actualmente, regista-se uma tendência para as formas clínicas da doença, com sintomas marcados, se tornarem subclínicas, geralmente subavaliadas, perpetuando a situação sem que os produtores se apercebam das perdas produtivas. De facto, mais que as formas clínicas e evidentes, de PCV2-SD, há que valorizar a fracção ainda mais representativa e frequentemente oculta da infecção subclínica a qual, utilizando a analogia do icebergue, corresponderá à sua base (Figura 4).

Figura 4. O PCV2 manifesta-se geralmente de forma subclínica, menos visível que a forma clínica (Adaptado de Sialelli, 2011)



Embora já não dotadas de um comportamento epizootico, as PCVD, sobretudo a PCV2-SD, podem ainda gerar situações de mortalidade residual durante a engorda devido a uma circulação subjacente do PCV2. A heterogeneidade dos lotes (que obriga ao envio faseado para o abate), os refugos, a má qualidade dos animais e os maus índices de conversão, afectam o lucro final do produtor. O clínico necessita também saber gerir o impacte emocional nos casos que exibem elevadas taxas de mortalidade.

Em cenários de infecção subclínica pelo PCV2, e embora não se observem sinais clínicos evidentes, vários dados de campo indicam que a vacinação contra o PCV2 é útil na melhoria dos parâmetros produtivos (GMD, percentagem de refugos, condição corporal e peso da

carcaça) (Laza et al., 2011; Venegas-Vargas et al., 2011). De facto, estima-se que em cerca de 98% dos casos a vacinação seja utilizada exclusivamente com este propósito, mais do que para combater as formas clínicas da infecção, cada vez mais raras (F. Fagundes, comunicação pessoal, Janeiro, 2012). A vacinação contra o PCV2 é uma prática corrente em Portugal, estimando-se que cerca de 50% da população suína nacional se encontre protegida (Henriques et al., 2011).

2.2. Importância das PCVD na Segurança Alimentar e na Saúde Pública

O potencial impacto das PCVD ao nível da Segurança Alimentar e da Saúde Pública tem vindo a tornar-se um importante assunto de debate. A par com a preocupação com o bem-estar animal, a segurança alimentar é a principal exigência do consumidor actual. Ao comprometer o sistema imunitário do hospedeiro, o PCV2 conduz ao aparecimento frequente de infecções bacterianas e virais graves, as quais exigem um tratamento mais estratégico por parte do médico veterinário na medida em que, muito frequentemente, as terapêuticas prescritas não funcionam; simultaneamente, os honorários e os custos da medicação aumentam sem resultados palpáveis.

A imunossupressão associada à PCV2-SD pode favorecer a contaminação com agentes patogénicos importantes, como *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni* ou *Yersinia enterocolitica* (Tucker & Donadeu, 2006). Outra preocupação premente refere-se ao aumento do uso de antibióticos, devido às tentativas de controlo de agentes secundários frequentemente associados à PCV2-SD, conduzindo a um potencial aumento na selecção de microrganismos resistentes e à detecção de resíduos de fármacos na carne. Nas explorações que sofrem de PCV2-SD, regra geral, os suínos são tratados mais frequentemente e com doses mais elevadas de fármacos, podendo o aumento do número de administrações parentéricas propiciar o aparecimento de lesões locais, como fibrose, descoloração ou colorações anormais, hemorragias ou abscessos. Adicionalmente, os resíduos das moléculas administradas podem ser prejudiciais aos processos fermentativos levados a cabo pela flora normal do músculo, favorecendo o desenvolvimento de estirpes particulares ou outros agentes patogénicos que afectam negativamente o sabor, o *flavour* e a cor do produto final (Merial, 2006).

A título de exemplo, no Reino Unido, onde a PCV2-SD emergiu entre 1998 e 1999, o uso de antibióticos na produção suína aumentou exponencialmente de 83 toneladas/ano em 1998 para 109 toneladas/ano em 2001, representando um aumento de 31%, apesar de uma redução de 7% no efectivo animal (Veterinary Medicines Directorate [VMD], 2002 citado por Tucker & Donadeu, 2006).

2.3. Circovírus Porcino Tipo 2 (PCV2)

2.3.1. História do PCV2

O circovírus porcino (*porcine circovirus* - PCV) foi inicialmente descrito em 1974, na Alemanha, como um contaminante persistente e não citopatogénico de uma cultura de células de rim de suíno PK-15. O PCV isolado desta cultura celular nunca foi implicado na ocorrência de casos naturais de doença (Chae, 2005) e, em condições experimentais, foi igualmente incapaz de produzir doença clínica em suínos (Allan et al., 1995).

Contudo, nos anos 90, uma nova variante do PCV foi associada a uma síndrome emergente. Em 1991, o médico veterinário canadiano John Harding documentou aumentos de mortalidade na ordem dos 12 a 15% num grupo de leitões de recria, acompanhados de morte súbita, emagrecimento acentuado, icterícia, diarreia e dispneia (Harding, 2008). A maioria dos animais afectados acabou por sucumbir. As análises anatomopatológicas realizadas pelo veterinário patologista Edward Clark a alguns destes animais revelaram a existência de uma marcada imunossupressão caracterizada por deplecção linfocitária e infiltração granulomatosa dos tecidos linfóides, indicativa de uma potencial implicação de resposta inflamatória. Devido ao envolvimento de variados sistemas orgânicos e à idade de apresentação de doença, Harding e Clark descrevem pela primeira vez a PMWS, uma síndrome devastadora que afecta principalmente os suínos de recria e engorda, também em explorações de elevado nível sanitário, que se caracteriza maioritariamente por emagrecimento progressivo, doença respiratória, enterite, aumento dos linfonodos, palidez e icterícia (Harding, 2008). Após exclusão de etiologia bacteriana, e dada a semelhança das lesões histopatológicas observadas com as registadas em infecções por outros circovírus, nomeadamente os aviários (Todd, 2004), aquelas amostras foram analisadas, tendo-se identificado a presença de um circovírus nos tecidos. Os primeiros estudos de sequenciação nucleotídica concluíram que existia menos de 80% de homologia entre o isolado avirulento da cultura celular e a nova variante patogénica associada à PMWS (Meehan et al., 1998; Tribble & Rowland, 2012), pelo que estes agentes foram denominados PCV1 (*porcine circovirus type 1* - circovírus porcino tipo 1) e PCV2, respectivamente (Segalés, 2008). Gradualmente, tornou-se evidente que o agente e a afecção recentemente caracterizados eram os causadores de uma grande percentagem das perdas registadas nos principais países produtores de suínos. Interessantemente, estudos retrospectivos de amostras de soro e tecidos arquivadas demonstraram que o PCV2 já circulava entre a população suína antes de 1991, tendo sido detectadas evidências da sua presença desde 1969 na Bélgica, 1970 no Reino Unido, 1973 na Irlanda, 1985 no Canadá e em Espanha e 1989 no Japão (Opriessnig et al., 2007; Gillespie et al., 2009). O primeiro caso de infecção pelo PCV2 foi retrospectivamente identificado na Alemanha em 1962, enquanto que os primeiros diagnósticos retrospectivos de PMWS datam apenas de meados dos anos 80 (Jacobsen et al., 2009), coincidindo com o aumento da prevalência do vírus. Estes resultados, juntamente

com a presença simultânea de PCV2 em explorações afectadas e não afectadas por PCV2-SD, parecem sugerir uma possível existência de diferenças de patogenicidade entre diversos isolados do vírus, ou mesmo uma eventual mutação para uma forma mais patogénica de PCV2. Aliás, alguns autores têm sugerido que a susceptibilidade dos hospedeiros às PCVD poderá ter sido aumentada devido a alterações de manejo introduzidas na indústria produtora de suínos.

Vários estudos serológicos demonstram a presença de anticorpos anti-PCV2 de forma global na população suína mundial, muitas das vezes em até 100% dos indivíduos analisados, facto compatível com o carácter ubiquitário do vírus (Gillespie et al., 2009).

2.3.2. Taxonomia, morfologia e organização genómica

O PCV1 e o PCV2 são actualmente reconhecidos pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (www.ictvonline.org) como duas espécies distintas dentro do género *Circovirus*.

Os circovírus porcinos, membros da família *Circoviridae*, são considerados os mais pequenos vírus com capacidade de replicação autónoma em células de mamíferos. Embora a maioria dos circovírus afecte aves, o PCV1 e o PCV2 atingem apenas suínos domésticos e selvagens (Faurez, Dory, Grasland & Jestin, 2009). Os circovírus são específicos dos hospedeiros ou possuem um espectro relativamente estreito de hospedeiros. Todos os circovírus actualmente conhecidos, excepto o PCV1, estão associados a doenças imunossupressoras ou imunodepressoras acompanhadas de deplecção linfóide ou infecção subclínica e persistente (Faurez et al., 2009). Todavia, apesar do seu carácter aparentemente apatogénico, um estudo recente envolvendo a inoculação de fetos com 55 dias de vida com vários isolados de PCV1 revelou a existência de replicação viral e o aparecimento de lesões pulmonares hemorrágicas no 21º dia pós-inoculação (p.i.) (Saha, Lefebvre, Ducatelle, Doorsselaere & Nauwynck, 2011); contudo, é ainda necessária pesquisa adicional para apurar sobre o possível carácter patogénico do PCV1 relativamente a fetos da espécie suína.

Os pequenos viriões sem envelope do PCV2, de aproximadamente 17 nm de diâmetro, exibem simetria icosaédrica e o ADN viral, envolvido por uma cápside proteica, é constituído por uma cadeia simples (ssADN) de forma circular, covalentemente fechada e ambisenso. Após infecção, o ssADN é convertido num intermediário de cadeia dupla (dsADN), também conhecido como forma replicativa (Fort, 2009). A região que contém a origem de replicação encontra-se delimitada por duas grelhas de leitura aberta (*open reading frames* - ORFs), ORF1 e ORF2. A ORF1 codifica as proteínas de replicação viral - replicases - Rep e Rep', enquanto a ORF2 codifica a proteína estrutural da cápside - Cap - que contém os epítomos antigénicos imunodominantes (Gillespie et al., 2009). Pensa-se que uma terceira ORF (ORF3) possa estar envolvida na codificação de uma proteína não essencial à replicação viral, envolvida em mecanismos de apoptose celular (Liu, Chen & Kwang, 2005; Lin, Chien,

Wu, Lai & Huang, 2011). Recentemente, Karupppannan et al. (2009) reportaram que leitões inoculados com um vírus mutante ORF3-deficiente exibiram menor grau de virémia e menos lesões patológicas típicas de PCV2-SD comparativamente a leitões inoculados com o vírus selvagem. Contudo, este constituinte não aparenta ser um determinante vital da patogênese do PCV2 (Finsterbusch & Mankertz, 2009). Além disso, e apesar de a molécula de ADN viral conter 11 ORFs putativas, só as proteínas codificadas por ORF1 e ORF2 foram identificadas em células infectadas (Meerts, 2005).

A análise das sequências genômicas do PCV1 e do PCV2 revelou a existência de uma maior variação da sequência nucleotídica entre ambas ao nível de ORF2 - 65% de homologia - o que se traduz em diferenças ao nível da cápside proteica e, consequentemente, em variações da patogenicidade do agente, dado que modificações ao nível da cápside viral têm implicações ao nível do tropismo celular e nas interações vírus-hospedeiro (Chae, 2004; Chae, 2005). Já a sequência nucleotídica de ORF1 encontra-se altamente conservada entre PCV1 e PCV2 - 86% de homologia - remetendo para a importância do complexo proteico Rep na sobrevivência destes vírus (Meerts, 2005).

2.3.3. Variação genética

O PCV2 é actualmente classificado em dois grupos filogenéticos distintos, comumente denominados genótipos 1 e 2 na Europa e PCV2b e PCV2a na América do Norte, respectivamente. Por sua vez, estes encontram-se divididos em vários subgrupos de acordo com as suas sequências de ADN. Vários destes isolados de todo o mundo têm sido sequenciados e analisados, demonstrando uma homologia de mais de 95% entre si (Chae, 2004; Tribble & Rowland, 2012). Dupont, Nielsen, Bækbo e Larsen (2008) descreveram pela primeira vez um terceiro genótipo, PCV2c, recuperado exclusivamente de tecidos de suínos dinamarqueses arquivados em 1980. Muito recentemente, e após o estudo de sequências de vários isolados de PCV2 chineses, foi sugerida a existência de dois genótipos adicionais, PCV2d e PCV2e (Zhai et al., 2011); contudo, estudos subsequentes não suportaram esta classificação (Cortey, Olvera, Grau-Roma & Segalés, 2011). Alguns autores são da opinião que não existem diferenças de virulência consistentes entre os dois principais genótipos, sendo a mesma função das propriedades individuais de cada isolado e não do genótipo considerado (Opriessnig et al., 2008a; Opriessnig et al., 2008b; Tribble & Rowland, 2012); até à data, os modelos experimentais de infecção têm originado dados inconclusivos quanto a esta questão.

Vários estudos mundiais têm revelado uma predominância crescente do PCV2b, apontando para uma possível alteração de PCV2a para PCV2b na maioria dos países produtores de suínos (Dupont et al., 2008; Kim, Ha, Oh & Chae, 2011; Rose et al., 2012), incluindo Portugal (Henriques et al., 2011).

A presença simultânea de vários isolados do mesmo ou de diferentes genótipos num mesmo indivíduo tem sido documentada em amostras de campo, tratando-se de um achado relativamente comum tanto em explorações afectadas por PCV2-SD como nas sem manifestação de doença clínica. Ao tentarem estabelecer uma possível correlação entre o genótipo de PCV2 e o estado de saúde dos animais analisados, Grau-Roma et al. (2008) observaram que os animais afectados por PCV2-SD continham sempre sequências pertencentes ao genótipo PCV2b, sendo o genótipo PCV2a mais associado a efectivos aparentemente saudáveis. A importância destas observações é desconhecida, embora possa robustecer a teoria que o genótipo PCV2b é, provavelmente, mais patogénico que o genótipo PCV2a. Esta hipótese é reforçada uma vez que a infecção experimental resultou em sinais clínicos típicos de PCV2-SD e lesões mais severas nos suínos infectados com PCV2b, comparativamente aos infectados com PCV2a (Cheung, Lager, Gauger, Vincent & Opriessnig, 2007). Curiosamente, na Austrália, local onde a PCV2-SD não foi reportada até ao momento, apenas foi identificado o genótipo PCV2a (Dupont et al, 2008). Contudo, não é de desvalorizar a ocorrência de vários surtos de PCV2-SD associados ao PCV2a, nos quais não foi recuperado PCV2b (Fossum, 2010), bem como a reprodução experimental de doença, embora pouco bem sucedida, mediante a utilização de ambos os genótipos. Recentemente, foi relatada a existência de infecção por um vírus quimérico resultante da recombinação entre os genótipos PCV2a e PCV2b (Hesse, Kerrigan & Rowland, 2008), embora se desconheça o significado biológico de tal acontecimento, nomeadamente no que se refere à patogénese do agente em causa.

2.4. Epidemiologia da infecção por PCV2 e da PCV2-SD

2.4.1. Distribuição geográfica e temporal

A importância da PCV2-SD varia consoante o momento e o país em questão. Provavelmente, antes da fase explosiva dos anos 90, a doença já existiria sob uma forma menos nefasta, manifestada pelo aparecimento de um reduzido número de leitões na recria ou no início de engorda exibindo sintomatologia sem que se conhecessem ao certo os factores implicados. Este facto leva a questionar porque razão as manifestações clínicas associadas ao PCV2 evoluíram de casos esporádicos e individuais para epidemias globais com graves consequências a nível sanitário e económico, e como pôde um vírus tão comum e presente em virtualmente todas as explorações tornar-se um agente patogénico tão importante em tão curto período de tempo.

A PCV2-SD já foi identificada em países de todos os cinco continentes, independentemente do tipo e tamanho do sistema de produção (Figura 5).

Figura 5. Ocorrência de PCV2-SD no mundo e ano dos primeiros acontecimentos (Adaptado de Chae, 2004 e Grau-Roma, Fraile & Segalés, 2011)



Primeiro, a doença comportou-se de modo tipicamente epizootico, disseminando-se quase globalmente num curto período de tempo pelo que, em 2002, poucos eram os países produtores de suínos poupados pela enfermidade. Num primeiro período, entre os anos 1991 e 1997, detectou-se PCV2-SD nos EUA e Canadá. Posteriormente, entre 1995 e 2004, a doença começou a ser descrita na UE e no continente asiático, exibindo um comportamento epizootico e exercendo um efeito económico muito importante sobre a produção. Mais recentemente, entre 2007 e 2008, a América do Norte experienciou uma nova epizootia. Estes dados sugerem que a PCV2-SD poderá alternar entre períodos de apresentação esporádica e epizootica (López-Soria et al., 2008).

Em Portugal, o primeiro caso de PCV2-SD data de 2000. Apesar de ter sido considerada a principal afecção da indústria de produção de suínos até 2004, regista-se actualmente uma tendência decrescente no que respeita ao aparecimento de novos casos (Segalés, 2007).

A infecção por PCV2 está tão disseminada na população de suínos domésticos que praticamente não se encontram explorações seronegativas em estudos epidemiológicos (López-Soria et al., 2005; Grau-Roma et al., 2009).

No âmbito da sua dissertação de mestrado, Lopes (2009) efectuou uma selecção de vários animais suspeitos de infecção por PCV2 (n=30) em 7 explorações de suínos da zona centro oeste de Portugal (Caldas da Rainha, Alcobaça e Santarém). Após necrópsia, recolheram-se amostras de linfonodo inguinal, pulmão, coração, fígado, rim, baço e, em alguns casos, linfonodo mesentérico associado a porções de intestino. A análise dos diversos tecidos recolhidos por hibridização *in situ* (*in situ hybridization* - ISH), permitiu concluir que o vírus circulava em 4 das 7 (57%) explorações consideradas. Henriques et al. (2011) analisaram, por meio de PCR, 177 amostras de casos suspeitos de infecção por PCV2 recolhidas entre 2003 e 2010 em várias regiões de Portugal continental (Leiria, Lisboa, Setúbal, Évora e Beja) e dos Açores (ilha de São Miguel). Estes autores verificaram que 44,6% das amostras

eram positivas para o agente. Apesar de algumas variações, o número de amostras analisadas decresceu a partir de 2008, fruto de um eficaz programa vacinal iniciado em 2007 (Henriques et al., 2011).

O uso generalizado de vacinas contra o PCV2 em explorações afectadas clínica ou subclínicamente pelo vírus, alterará provavelmente o estado sanitário dos efectivos, que passará de períodos de surtos clínicos gravíssimos para infecções subclínicas autolimitantes com surtos ocasionais (Segalés, 2012).

2.4.2. Susceptibilidade do hospedeiro

Os suínos domésticos e selvagens são os hospedeiros naturais do vírus (Segalés, Allan & Domingo, 2006). Estudos serológicos realizados noutras espécies, nomeadamente bovinos, caprinos, ovinos, equinos, aves, canídeos, felídeos, leporídeos, ratos e humanos, não demonstraram evidências de infecção por PCV2, pelo que é possível considerar que estas espécies não desempenham um papel importante na epidemiologia do agente (Grau-Roma et al, 2011).

A infecção por PCV2 no javali (*Sus scrofa*) pode conduzir a manifestações de PCV2-SD, embora a importância epidemiológica da afecção continue por determinar por completo nesta espécie. Vicente et al. (2004) descreveram o primeiro caso confirmado de PCV2-SD em javalis da Península Ibérica, estabelecendo a ocorrência da doença no javali europeu. O animal em causa, de aproximadamente 6 meses de idade, evidenciava lesões de depleção linfocitária com infiltração histiocítica moderada dos tecidos linfóides, tendo sido detectada uma elevada quantidade de genoma viral nos seus tecidos, tal como descrito nos suínos domésticos. Contudo, os autores salientam a incapacidade de justificar as diferenças existentes ao nível da idade de apresentação entre suínos domésticos e selvagens. Neste estudo, amostras de soro de 656 javalis de vários grupos etários foram sujeitas a uma análise de imunoperoxidase em monocamada (*imunoperoxidase monolayer assay- IPMA*), tendo sido detectados títulos de anticorpos anti-PCV2 médios a elevados em cerca de 48% dos indivíduos.

2.4.3. Vias de transmissão

É primordial a distinção entre transmissão do PCV2 e transmissão da doença (López-Soria et al., 2008). A transmissão horizontal é o principal meio através do qual os animais se infectam. Mesmo que a transmissão por via aérea não possa ser formalmente excluída, o contacto directo é certamente a via de transmissão mais eficaz, devido à exposição simultânea de animais susceptíveis a secreções respiratórias, digestivas e urinárias contaminadas (Rose et al., 2012). O PCV2 pode potencialmente ser veiculado por todas as vias de excreção, sendo detectável nas secreções nasais, bronquiais e oculares, saliva, fezes e urina de animais clinicamente afectados e animais infectados subclínicamente,

sendo que os últimos disseminam uma quantidade de vírus inferior comparativamente aos animais doentes (Segalés et al., 2005; Rose et al., 2012). O agente também foi detectado no colostro e no leite de porcas infectadas por via natural (Shibata, Okuda, Kitajima & Asai, 2006) e experimental (Ha et al., 2009; Park et al., 2009), indicando que o PCV2 é distribuído na glândula mamária durante o período de virémia e posteriormente transmitido aos leitões por via oral. A detecção de ADN e proteínas virais na glândula mamária sugere uma possível replicação viral nestes tecidos (Park et al., 2009).

A via oro-nasal é considerada a mais provável e frequente via de infecção e de transmissão do PCV2 (Segalés et al., 2007). Patterson et al. (2011) monitorizaram quantitativamente a disseminação do vírus através das vias oral, nasal e fecal durante 69 dias p.i. em suínos experimentalmente infectados. Apesar de o ADN viral ter sido recuperado em todas as amostras, sem diferenças quantitativas significativas, detectou-se uma quantidade ligeiramente maior de ADN viral nas amostras de secreções nasais, o que poderá implicar o contacto com estas como a via de transmissão mais importante.

Alguma informação publicada sugere que o PCV2 possa também ser transmitido a suínos *naïves* por intermédio da ingestão de tecidos (músculo esquelético, medula óssea e tecidos linfóides) não termicamente processados pertencentes a animais virémicos (Opriessnig, Patterson, Meng & Halbur, 2009a). De acordo com estes dados, e tendo em conta a extrema resistência térmica e química do agente, o consumo de produtos de origem animal, como proteínas do plasma, poderá representar um potencial risco de transmissão.

O potencial de transmissão horizontal de PCV2-SD foi avaliado num estudo neozelandês que demonstrou o desenvolvimento de doença em suínos saudáveis que contactaram directa ou indirectamente com suínos afectados, embora só os animais misturados às 4 semanas de idade tenham desenvolvido a doença, algo que não se verificou nos animais misturados às 12 ou mais semanas de idade (Jaros et al., 2006). Concordantemente, a idade a que ocorre a exposição ao PCV2 parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento de PCV2-SD (Segalés et al., 2007; Tomás, Valero, Fernandes & Segalés, 2008). Kristensen et al. (2006) verificaram que a transmissão de PCV2-SD entre animais clinicamente doentes e animais saudáveis ocorre mais frequentemente entre indivíduos em contacto directo (no mesmo parque); contudo, a transmissão também é possível entre indivíduos de parques contíguos e até mesmo afastados entre si por alguns metros. Num estudo mais recente, foi observada a transmissão de PCV2-SD a suínos PCV2 positivos clinicamente saudáveis, depois de estes serem transportados e misturados com suínos de grupos doentes (Kristensen et al., 2009).

Embora não se conheça ao certo o mecanismo e a frequência de tal evento, o PCV2 também pode ser transmitido verticalmente, isto é, de uma geração para a outra por infecção do embrião ou do feto no útero (López-Soria et al., 2008). A transmissão transplacentária pode ocorrer durante a virémia na reprodutora, tendo sido comprovada

após infecção intranasal de porcas 3 semanas antes do parto, pois isolou-se ADN viral nos tecidos linfóides da sua descendência (Ha, Lee, Ahn, Kim & Chae, 2008). Por esta razão, os autores consideram esta via como tendo um papel importante no desenvolvimento de PCV2-SD no período pós-natal. A replicação viral tem igualmente sido implicada no aparecimento de lesões nos tecidos fetais, nomeadamente no miocárdio (miocardite) de fetos abortados, mumificados ou nascidos mortos em casos de problemas reprodutivos (West et al., 1999). Todavia, vários outros estudos demonstraram resultados divergentes e inconclusivos, considerando a transmissão transplacentária relativamente rara e localizando a maioria das infecções por PCV2 no pós-parto. O potencial do PCV2 como patogéneo fetal parece ser relativamente reduzido, uma vez que a maioria dos efectivos reprodutores terá um elevado estatuto imunitário contra o agente, sendo excepção os efectivos contendo um elevado número de marrãs seronegativas (Sanchez, Nauwynck, McNeilly, Allan & Pensaert, 2001; Opriessnig et al., 2007).

O PCV2 é disseminado no sémen de varrascos natural e experimentalmente infectados, mesmo no dos que exibem anticorpos no soro (Madson et al., 2008; Madson et al., 2009a). O vírus disseminado no sémen de varrascos experimentalmente infectados é infeccioso, tendo-se detectado virémia, seroconversão e lesões compatíveis com a infecção por PCV2 em leitões de 4 semanas de idade inoculados intraperitonealmente com sémen destes animais. Contudo, o mesmo sémen utilizado na inseminação artificial (IA) de porcas *naïves* não causou problemas reprodutivos, seroconversão ou virémia nas mesmas ou na sua descendência (Madson et al., 2009a). Os autores atribuem este acontecimento à baixa quantidade de vírus presente nas doses de inseminação utilizadas, estabelecendo a dose viral presente no sémen como uma possível condicionante da transmissão do PCV2 através da IA (Madson et al., 2009a). Os mesmos autores obtiveram resultados opostos noutro ensaio, no qual porcas *naïves* inseminadas artificialmente com sémen alvo de *spiking* com PCV2 exibiram virémia e problemas reprodutivos, tendo os seus fetos, inclusivamente os nados vivos clinicamente saudáveis, sido infectados. Deste modo, a infecção intrauterina pode originar alguns leitões aparentemente saudáveis infectados ao nascimento, os quais podem actuar como uma eventual fonte de transmissão do vírus antes da vacinação dos animais (Madson et al., 2009b). Este acontecimento foi alvo de estudos experimentais, concluindo-se que a extensão da replicação viral nos fetos varia com a idade gestacional (Sanchez et al., 2001). A ocorrência muito precoce de infecção traduz-se em virémia, lesões microscópicas e presença de antígeno viral nos tecidos. Em fetos infectados mais tardiamente, com mais de 70 dias de gestação, a ausência destes acontecimentos, acompanhada da detecção de anticorpos anti-PCV2, é atribuível ao estabelecimento de imunocompetência fetal, sendo a infecção eliminada previamente ao parto (Sanchez et al., 2001; Madson et al., 2009c). No entanto, desconhece-se se a quantidade de PCV2 disseminada no sémen de varrascos naturalmente infectados é suficiente para a infecção de

porcas ou dos seus fetos. Além disso, na maioria das situações de campo, uma única colheita de sémen de um varrasco é diluída e misturada com colheitas de outros varrascos, o que se reflecte na eventual diminuição da quantidade de PCV2 em cada dose de sémen utilizada na IA (Madson et al., 2009a). Os varrascos podem continuar a disseminar o vírus sem manifestações clínicas e sem alterações nos parâmetros de qualidade do sémen (Madson et al., 2008), pelo que é difícil excluir totalmente a IA como possível via de transmissão do vírus.

A disseminação precoce e persistente por uma grande variedade de vias de excreção sugere que o PCV2 se difunde facilmente entre a população suína, tanto por via horizontal como vertical; além disso, a elevada prevalência da infecção por PCV2 na maioria dos efectivos de todos os países produtores de suínos reforça a ideia que a transmissão do agente se processa de forma muitíssimo eficaz (Rose et al., 2012).

2.5. Patogénese

A patogénese da infecção por PCV2 encontra-se ainda relativamente mal elucidada e os mecanismos pelos quais o agente reconhece, adere e penetra nas células encontram-se ainda em estudo. Pensa-se que o vírus utiliza um receptor celular relativamente comum, dado que o antigénio viral é observado numa grande variedade de células (Darwich, Segalés & Mateu, 2004). Devido ao reduzido genoma e consequente limitada capacidade de codificação proteica, o ciclo de vida do vírus baseia-se predominantemente na célula hospedeira (Finsterbusch & Mankertz, 2009). Assim, uma vez que o PCV2 não codifica para as suas próprias ADN polimerases, necessita de células na fase S do ciclo celular para que consiga completar o seu ciclo infeccioso (Allan & Ellis, 2000; Darwich et al., 2004; Parrish, 2011). Deste modo, assume-se que as células com taxas mitóticas mais elevadas são as que mais eficientemente suportam a replicação do PCV2, permitindo a entrada do genoma viral no núcleo e os subsequentes processos de replicação, transcrição e encapsidação (McCullough, Ruggli & Summerfield, 2009). Esta característica, determinante da sua patogénese, explica a razão para a replicação viral se encontrar maximizada em células em divisão nos tecidos de animais jovens (Parrish, 2011). Por exemplo, quando fetos suínos são infectados experimentalmente com PCV2, a distribuição do vírus correlaciona-se com tecidos ou tipos celulares com taxas mitóticas mais elevadas, como os cardiomiócitos fetais (Sanchez, Meerts, Nauwynck & Pensaert, 2003). Similarmente, a replicação do PCV2 é também potenciada durante períodos de imunoestimulação, o que resulta na proliferação de linfócitos nos quais o vírus se pode eventualmente multiplicar (Parrish, 2011).

2.5.1. Células-alvo

O PCV2 é capaz infectar células de origem epitelial, endotelial e mielóide, o que explica a sua ampla distribuição nos tecidos de animais infectados (Segalés, Rosell & Domingo, 2004). O antígeno e os ácidos nucleicos virais podem ser detectados no citoplasma dos macrófagos e das células dendríticas (CD) que substituem os linfócitos nos folículos dos tecidos linfóides afectados, bem como nos macrófagos alveolares e nas células de Kupffer. Para além das células da linhagem monocítica/macrofágica, o vírus é detectado no citoplasma e, ocasionalmente, no núcleo de fibroblastos, linfócitos, células acinares e ductais pancreáticas, células endoteliais, células musculares lisas e vários tipos de células epiteliais, como células epiteliais renais e do tracto respiratório, hepatócitos e enterócitos (Rosell et al., 1999; Allan & Ellis, 2000; Sorden, 2000; Langohr et al., 2010). Tal evidência permite concluir que o PCV2 é capaz de infectar e/ou replicar-se numa grande variedade de tipos celulares ou células que se encontram comumente presentes em diferentes órgãos (Meerts, 2005).

Mesmo que o antígeno e o genoma virais possam ser identificados numa grande variedade de tipos celulares, tal observação não implica necessariamente ocorrência de replicação viral, pelo que a aplicação de novas técnicas de investigação indica que a replicação do PCV2 processar-se-á principalmente nos linfonodos, pulmões, amígdala e fígado (Yu et al., 2007). Apesar de alguns trabalhos excluïrem os macrófagos e os linfócitos como alvo de replicação do PCV2 (Rosell et al., 1999; Vincent et al., 2003), um estudo *in vivo* (Yu et al., 2007) recente contrapõe os estudos anteriores, estabelecendo os linfócitos B e T como importantes populações celulares que suportam o processo replicativo do agente numa fase inicial. A deplecção linfóide observada nos tecidos linfóides foliculares e parafoliculares apresenta uma correlação elevada com a diminuição do número de linfócitos B e T circulantes, podendo ser consequência de fenómenos de apoptose induzida, diminuição da produção de linfócitos na medula óssea ou redução da sua produção em tecidos linfóides secundários (Opriessnig et al., 2007). Contudo, ainda nenhum estudo conseguiu esclarecer se a perda de linfócitos resulta do efeito directo do PCV2 ou se a mesma se trata de uma consequência indirecta das respostas ao vírus. Parece igualmente existir uma correlação entre a quantidade de antígeno viral ou material genético detectado no tecido afectado, a gravidade da deplecção linfocitária e o quadro clínico (Rosell et al., 1999; Darwich et al., 2004; Krakowka, Ellis, McNeilly, Waldner & Allan, 2005).

Um estudo sobre a infecção e a replicação do PCV2 em cinco tipos celulares diferentes - uma linha de células endoteliais suína, células endoteliais aórticas suínas, células epiteliais intestinais, CD e fibrócitos - permitiu concluir que a replicação do vírus ocorre em todas as células estudadas, excepto nas CD (Steiner, Balmelli, Herrman, Summerfield & McCullough, 2008). Alguns autores sugerem que as propriedades fagocíticas ou endocíticas destas células são altamente responsáveis pela presença do antígeno viral no seu citoplasma

(Vincent et al., 2003; Vincent et al., 2005), sendo a elevada quantidade de antígeno viral encontrada nos macrófagos e CD dos animais afectados o resultado da acumulação de partículas virais sem degradação (Vincent et al., 2003; Darwich et al., 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* confirmaram que o PCV2 consegue infectar as CD, nelas permanecendo persistentemente por longos períodos de tempo sem aparente replicação activa, perda de infectividade ou indução de morte celular (Vincent et al., 2003). Deste modo, apesar de as CD não representarem o local alvo de replicação do PCV2, podem constituir um importante interveniente no mecanismo de disseminação do vírus no hospedeiro, processo facilitado pela sua capacidade migratória (Vincent et al., 2003). O longo período clínico das PCVD e a natureza persistente da infecção viral suportam estes resultados. Além do mais, o PCV2 possui a capacidade de afectar negativamente o funcionamento desta população celular, factor crítico devido ao seu papel central na mediação de respostas imunes inatas e adquiridas antivirais (Fort, 2009).

O tropismo celular do vírus parece modificar-se de acordo com estado de maturação do animal (Sanchez et al., 2003). Após infecção experimental durante a vida fetal, o antígeno viral é detectado principalmente nos cardiomiócitos e, em menor extensão, nos hepatócitos e nos macrófagos, o que estabelece o coração como local primário de replicação do PCV2 nos fetos (Sanchez et al., 2001; Sanchez et al., 2003). Subsequentemente, no período pós-natal, o tropismo do agente modifica-se, sendo o antígeno viral encontrado maioritariamente nos macrófagos dos leitões. O vírus é igualmente capaz de replicar-se *in vivo* em mórulas e blastocistos livres de zona pelúcida, sendo os estadios embrionários mais avançados os mais susceptíveis (Mateusen et al., 2004).

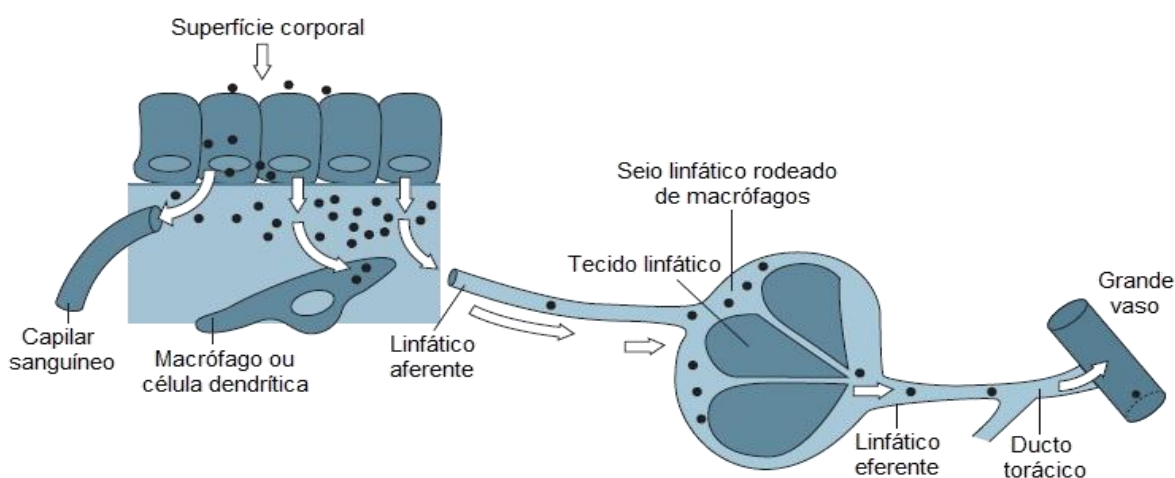
2.5.2. Disseminação do vírus e dinâmica da infecção

A dose infecciosa mínima de PCV2 é desconhecida, embora a dosagem do inóculo utilizado pareça não tratar-se de um factor-chave no que respeita ao desenvolvimento de PCV2-SD. Além disso, a natureza multifactorial da afecção dificulta o estabelecimento de uma dose mínima de vírus necessária para provocar doença (Segalés et al., 2007). Ainda assim, um estudo de meta-análise de várias infecções experimentais revelou que, quanto mais elevada a dose de inóculo utilizada, maior a percentagem de animais afectados por PCV2-SD (Tomás et al., 2008). Contudo, estes autores relativizam estes resultados e ressalvam que se conhecem experiências nas quais a utilização de uma dose baixa de inóculo foi bem sucedida na infecção.

Rosell et al. (1999), ao caracterizarem a distribuição tecidual e celular do antígeno e genoma virais em animais clinicamente afectados por PCV2-SD após infecção natural, concluíram que a patogénese envolverá a entrada do PCV2 por via oronasal e que, uma vez no interior do hospedeiro, o vírus infectará primeiro as amígdalas e os linfonodos da cabeça, começando então a replicar-se; finalmente, ocorrerá disseminação sistémica a outros

tecidos linfóides e órgãos parenquimatosos, como o pulmão, o fígado ou o rim. Yu et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes, especulando que a replicação do PCV2 iniciar-se-á nos linfonodos mais perto do local de infecção, podendo os mesmos desempenhar um papel importante na persistência do vírus no hospedeiro infectado. Uma vez que o PCV2 consegue infectar as células B, é assim facilmente disseminado pelo organismo do hospedeiro através do sistema linfático. A replicação viral iniciar-se-á depois nas células T e nas células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMCs) (Yu et al., 2004 citado por Yu et al., 2007), ocorrendo então distribuição sistémica (Figura 6).

Figura 6. Invasão epitelial e disseminação linfática da infecção¹ (Fonte: MacLachlan & Dubovi, 2011a)



A virémia é detectável, em média, entre 7 a 14 dias após a inoculação do vírus, atingindo os títulos virais um pico aproximadamente entre os dias 14 e 21 p.i. (McKeown et al., 2005; Opriessnig et al., 2008a). Nesta fase, o PCV2 é detectável em vários órgãos, embora as cargas virais mais elevadas sejam tipicamente encontradas nos tecidos linfóides.

A PCV2-SD afecta mais comumente suínos entre as 7 e as 16 semanas de idade (Allan & Ellis, 2000; Segalés & Domingo, 2002; Harding, 2004), entre a fase final de recria e a fase inicial de engorda. No entanto, podem observar-se variações na idade de apresentação da doença. Na realidade, nas actuais condições de campo, a PCV2-SD afecta suínos cada vez mais velhos e, contrariamente ao observado nos primórdios da doença, a engorda é particularmente atingida, apresentando-se a sintomatologia, em alguns casos, tão tardiamente como às 15 a 20 semanas de idade (Marco, 2009; Kekarainen et al., 2010; Martelli et al., 2011; R. Mesquita, comunicação pessoal, Janeiro, 2012).

A dinâmica de infecção é semelhante à de outras infecções virais em suínos. Tanto as explorações afectadas como as explorações não afectadas por PCV2-SD exibem uma dinâmica de infecção e uma seroconversão semelhantes (Sibila et al., 2004; Segalés et al.,

¹ Note-se que os linfonodos dos suínos são estruturalmente invertidos comparativamente às outras espécies domésticas, o que não é evidente na figura apresentada.

2006; Brunborg et al., 2010). Todavia, a dinâmica de infecção pode variar em função das características da população considerada e, mesmo dentro da exploração em questão, podem existir variações individuais (Segalés, 2008).

Devido ao uso de vacinas e à natureza ubiquitária do PCV2, a grande maioria das reprodutoras é exposta à estirpe de campo ou à estirpe vacinal, exibindo a sua descendência níveis variáveis de anticorpos anti-PCV2 adquiridos passivamente (Opriessnig, Patterson, Elsener, Meng & Halbur, 2008c). O facto de os leitões não exibirem PCV2-SD antes das 4 semanas de idade sugere um papel protector e neutralizador destes anticorpos de origem materna (*maternally derived antibodies* - MDA), veiculados no colostro; não obstante, uma pequena percentagem de animais pode apresentar-se já infectada pelo PCV2 nos primeiros dias de vida (Sibila et al., 2004). McKeown et al. (2005) demonstraram que a magnitude da protecção conferida aos leitões é título-dependente, ou seja, títulos de MDA elevados são mais protectores que títulos reduzidos, embora não previnam completamente a infecção e o consequente aparecimento de virémia; os títulos diminutos não fornecem qualquer protecção, deixando os leitões muito susceptíveis a uma infecção precoce. O tempo de semi-vida dos MDA situar-se-á entre os 15 e os 19 dias (Fort et al., 2009b; Gillespie et al., 2009). Opriessnig, Yu, Thacker e Halbur (2004) concluíram que nos leitões com títulos iniciais de MDA baixos, estes entrarão em declínio entre as 4 e as 6 semanas de idade, enquanto que nos leitões com títulos iniciais de MDA elevados, tal ocorrerá entre as 8,5 e as 13,5 semanas de idade. Em condições de campo, os MDA decaem tipicamente entre os períodos de lactação e de recria, coincidindo com o aumento da proporção de animais PCV2 positivos e das cargas virais registadas (Fort, 2009).

Na sequência destes eventos, dá-se uma seroconversão activa, com produção de anticorpos por parte do indivíduo. Esta seroconversão ocorre geralmente entre as 7 e as 15 semanas de idade, podendo os anticorpos manter-se, pelo menos, até às 28 semanas de idade (Rodríguez-Arriola et al., 2002). Contudo, uma percentagem variável de animais em crescimento ou adultos sem sinais clínicos de doença, infectados subclínicamente, continua a exibir virémia (de longa duração, entre 5 a 12 semanas) apesar dos elevados títulos de anticorpos, sugerindo que a imunidade humoral poderá não ser totalmente protectora (Rodríguez-Arriola et al., 2002; Sibila et al., 2004; Segalés et al., 2006). Ainda assim, o início da produção de anticorpos anti-PCV2 coincide tipicamente com a diminuição dos títulos virais, traduzindo-se numa redução progressiva da virémia (Meerts, Van Gucht, Cox, Vandebosch & Nauwynck, 2005; Opriessnig et al., 2008a).

Em animais infectados experimentalmente, começam a desenvolver-se respostas imunes específicas contra o PCV2 entre os 14 e os 28 dias p.i. (Gillespie et al., 2009; Segalés et al., 2006; Meerts et al., 2005; Opriessnig et al., 2004). Já outros estudos descrevem o aparecimento dos primeiros anticorpos anti-PCV2 entre os 11 e os 35 dias p.i. (Opriessnig et al., 2008a; Patterson et al., 2011).

Os animais afectados pela PCV2-SD, clinicamente doentes, exibem uma resposta humoral mais fraca e tardia comparativamente aos animais subcl clinicamente infectados, sem PCV2-SD (Fort et al., 2007). Simultaneamente, observa-se que estes animais possuem títulos reduzidos ou ausentes de anticorpos neutralizantes (*neutralizing antibodies* - NA) anti-PCV2, o que se traduz numa replicação viral aumentada acompanhada de graves lesões linfóides e alterações significativas do sistema imunitário que culminam com o desenvolvimento de doença (Meerts et al., 2006). Estes resultados sugerem a existência de uma resposta humoral alterada nos animais clinicamente doentes.

2.5.3. Imunopatogénese da infecção por PCV2

O efeito do PCV2 no sistema imunitário dos suínos infectados é importante na patogénese da doença, tendo sido sugerido que fenómenos simultâneos de imunossupressão e de imunoestimulação possam estar envolvidos no seu desenvolvimento. A sintomatologia e as lesões observadas em casos de doença clínica são indicativas de uma disfunção imunológica, pois os animais afectados por PCV2-SD exibem extensas lesões linfóides acompanhadas de depleção dos linfócitos B e T e infiltração granulomatosa, bem como uma alteração dos padrões de expressão de citocinas nas PBMCs e nos órgãos linfóides (Kekarainen, Montoya, Mateu & Segalés, 2008; Kekarainen et al., 2010). Também a ineficácia dos tratamentos antimicrobianos, particularmente contra bactérias envolvidas na patogénese de doenças do foro respiratório (Darwich & Mateu, 2011) e a observação de percentagens de perdas variáveis atribuíveis a outros agentes patogénicos secundários e a agentes infecciosos oportunistas, contribuem para cimentar a hipótese de que a PCV2-SD se trata de uma imunodeficiência adquirida (Darwich et al., 2004) e de que o vírus possui a capacidade de modular as defesas imunitárias do hospedeiro.

O PCV2 é um exemplo clássico de um vírus capaz de modular a actividade das CD na ausência de replicação nas mesmas (McCullough et al., 2009), na medida em que as infecta sem evidenciar capacidade replicativa, como referido anteriormente. As CD são as mais potentes células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells* - APCs), desempenhando um papel fundamental na indução de uma imunidade protectora contra as infecções virais (Benchereau & Steinman, 1998). Podem ser divididas em duas subpopulações principais, as CD mielóides (mCD), cuja principal função é a apresentação de antígenos; e as CD plasmocitóides (pCD) - igualmente denominadas células produtoras de interferão (*natural interferon producing cells* - NIPCs) - responsáveis pela produção de interferão (IFN) tipo I. As CD são eficazes estimuladoras dos linfócitos B e T, porém, enquanto que as células B conseguem reconhecer directamente os antígenos através de receptores próprios, por reconhecerem apenas fragmentos de antígenos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* - MHC) presentes na superfície das APCs, os linfócitos T necessitam que o antígeno lhes

seja apresentado pelas CD. Subgrupos particulares de mCD localizados na maioria dos tecidos e órgãos do corpo captam e processam os antígenos, exibindo moléculas do MHC à superfície. De seguida, migram para os folículos linfóides, interagindo com os linfócitos T aí presentes, apresentando-lhes o antígeno. As mCD encontram-se nos tecidos e nas superfícies mucosas num estado denominado “imaturo”, incapaz de estimular as células T. A maturação das mCD é, por isso, crucial para a iniciação da imunidade. Uma vez activadas pelas mCD maduras, as células T completam a resposta imune, interagindo com os linfócitos B para produção de anticorpos, ou com os macrófagos para libertação de citocinas (Benchereau & Steinman, 1998). Para além das propriedades estimuladoras das células T, as mCD estão também envolvidas na promoção de respostas por parte dos linfócitos B, na activação das células *natural killer* (NK) e na comunicação com os neutrófilos (Summerfield & McCullough, 2009). As mCD imaturas são particularmente responsivas a sinais de “perigo”, que conduzem à sua activação e subsequente maturação, pelo que o seu reconhecimento, juntamente com um correcto processamento do antígeno, são indispensáveis ao desenvolvimento de respostas imunes inatas e adquiridas. As mCD, tal como outras células presentes nas potenciais portas de entrada de vírus, possuem receptores de superfície (*pattern recognition receptors* - PRR) envolvidos na iniciação, promoção e execução das respostas imunes (McCullough et al., 2009). Os PRR reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMP), macromoléculas presentes nos agentes patogénicos, mas não nas células hospedeiras. Os *toll-like receptors* (TLR) são importantes exemplos de PRR, cuja ligação é um importante evento na promoção do reconhecimento do “perigo” pelas CD (McCullough et al., 2009; Summerfield & McCullough, 2009). A ligação dos PAMP aos PRR desencadeia uma activação celular abrupta, induzindo a libertação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, essenciais ao desenvolvimento de uma eficaz resposta imune adquirida (Summerfield & McCullough, 2009). O reconhecimento de um determinado PAMP representa o sinal de “perigo” que as mCD necessitam para ser activadas. As pCD respondem igualmente aos ataques virais por intermédio de PRR produzindo importantes quantidades de citocinas como o factor de necrose tumoral alfa (*tumoral necrosis factor* α - TNF- α), a interleucina (IL)-6 e a IL-12. Ao responderem a CpG-oligonucleótidos (CpG-ODN) presentes em vários vírus e ADNs bacterianos com a produção de IFN- α e TNF- α , as pCD induzem a maturação das mCD (Vincent et al., 2005).

A infecção das CD pelo PCV2 induz-lhes alterações funcionais, dependentes da subpopulação considerada. Apesar da acumulação de antígeno nas mCD, estas continuam capazes de responder a sinais de “perigo” com produção de citocinas pró-inflamatórias, não se verificando interferências aparentes com a capacidade de captação, processamento e apresentação de antígenos e maturação das CD (Vincent et al., 2005). Inversamente, a presença do vírus nas pCD compromete a sua capacidade de reconhecimento dos sinais de

perigo, suprimindo a produção de IFN- α e TNF- α impedindo, consequentemente, a maturação autócrina das NIPCs e a maturação parácrina das mCD. Deste modo, os mecanismos dependentes destas citocinas, como efeitos antivirais directos, maturação das mCD, activação das células NK e promoção de respostas T e B, tornam-se menos eficientes ou ineficazes, potenciando não só a sobrevivência do PCV2, como reduzindo a capacidade de combate a infecções paralelas ou secundárias por parte do hospedeiro (Vincent et al., 2005). A interferência entre o PCV2 e as pCD encontra-se dependente do genoma viral, sobretudo do dsADN da forma replicativa (Vincent et al., 2007; Kekarainen et al., 2008). Num estudo recente (Balmelli et al., 2011), o dsADN da forma replicativa do PCV2 evidenciou possuir uma elevada capacidade imunomodulatória, interferindo com rearranjos do citoesqueleto e processos endocíticos nas pCD e nas mCD, respectivamente. Estes dados favorecem a hipótese que o genoma viral contém sequências capazes de modificar e modular as funções das CD e influenciar o desenvolvimento das defesas imunitárias, contribuindo para o desenvolvimento de doença clínica (Kekarainen et al., 2010). Contudo, a interacção entre PCV2 e o sistema imunitário do hospedeiro é altamente complexa, sendo a regulação da produção de citocinas função dos elementos virais e/ou da população celular estudados (Kekarainen et al., 2008).

As características lesões linfóides de inflamação granulomatosa, crónica, sugerem que a infiltração de macrófagos/monócitos pode estar intimamente relacionada com a patogénese e a progressão da PCV2-SD (Chae, 2004). Kim & Chae (2004) identificaram uma intensa e consistente expressão de proteína quimiotáctica dos monócitos (*monocyte chemoattractant protein-1* - MCP-1) e de proteína inflamatória dos macrófagos (*macrophage inflammatory protein-1* - MIP-1) nas lesões de inflamação granulomatosa em linfonodos de suínos infectados por PCV2 que apresentavam sintomatologia clínica. Os autores consideraram que a expressão destas quimiocinas pelos macrófagos e outras células inflamatórias é induzida directamente como resposta à presença do vírus, provocando uma intensa chamada de monócitos ao local os quais, uma vez recrutados, podem levar à amplificação da resposta.

Estudos de campo evidenciam que os suínos afectados pela doença clínica exibem alterações significativas dos padrões de expressão de citocinas nos tecidos linfóides e nas PBMCs. Este desequilíbrio é caracterizado por uma sobreexpressão de IL-10 no timo dos animais afectados, acompanhada de depleção e atrofia tímicas (Darwich et al., 2003a). A avaliação do perfil de citocinas em amostras de soro de animais experimentalmente inoculados com PCV2 revelou uma associação entre os níveis de IL-10 e o desenvolvimento de PCV2-SD, com níveis elevados nos indivíduos que desenvolveram doença clínica comparativamente aos que permaneceram infectados subclínica (Stevenson 2006, citado por Kekarainen et al., 2010). Nos animais subclínica infectados identificou-se um aumento transitório dos níveis de IL-10 que se correlacionou com a fase virémica da

infecção (Darwich et al., 2008); estes resultados sugerem que a recuperação da infecção poderá estar associada ao término da produção de IL-10. No entanto, desconhece-se se a produção de IL-10 deriva da replicação viral ou se se trata do evento despoletador que permite ao vírus multiplicar-se mais eficazmente.

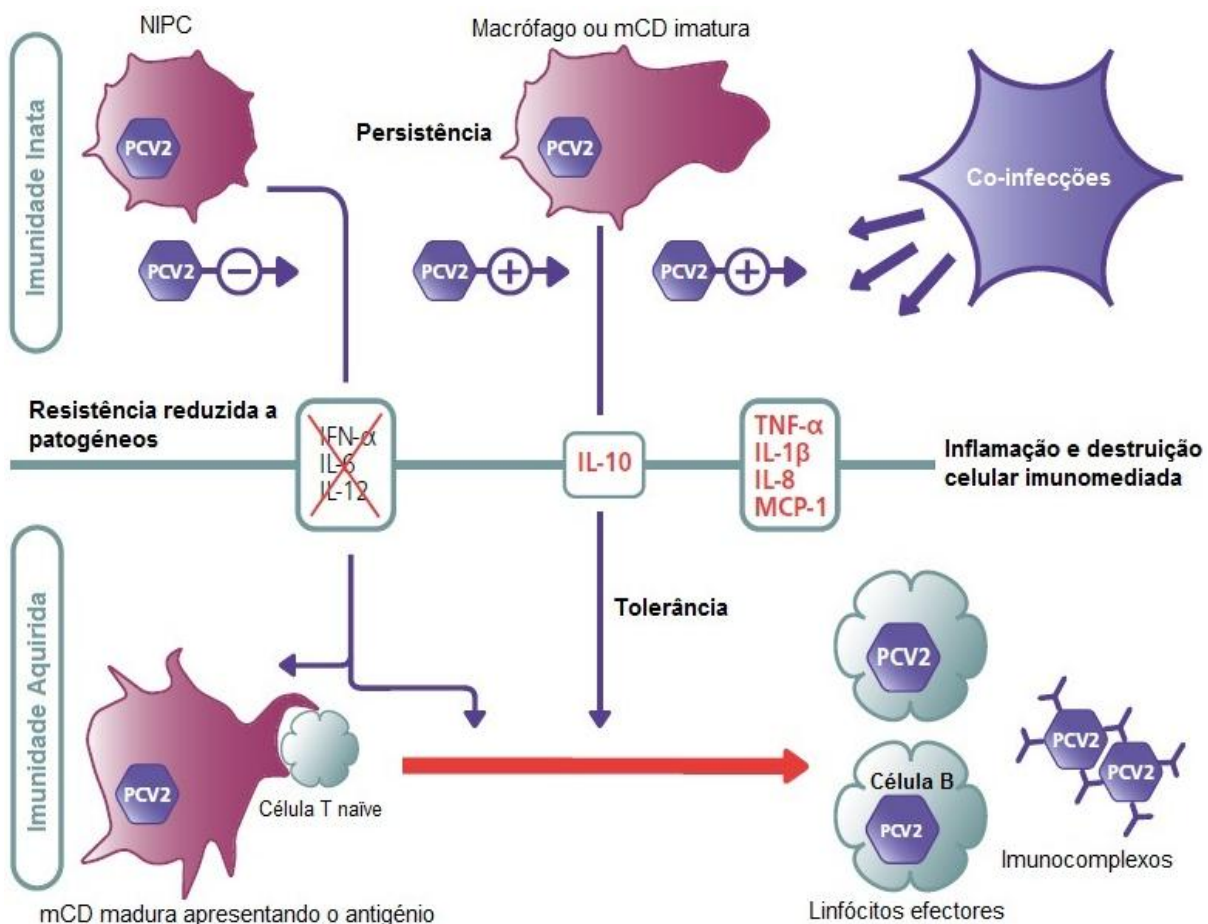
O PCV2 possui igualmente a capacidade de induzir *in vitro* a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-8 em PBMCs de suínos *naïves* infectados, o que permite explicar a natureza inflamatória crónica da PCV2-SD (Darwich et al., 2003b). O mesmo estudo evidenciou que, face à estimulação com mitogéneos ou superantigénios, as PBMCs de suínos com PCV2-SD possuem menor capacidade de produção de IL-2, IL-4 e IFN- γ comparativamente às PBMCs de suínos saudáveis e PCV2 negativos, o que sugere um prejuízo da resposta imunitária mediada por células T. Fort et al. (2009a), usando um modelo de infecção com PCV2 combinado com lipopolissacárido (LPS) como factor de imunoestimulação, obtiveram resultados semelhantes.

Um estudo *in vitro* realizado por Kekarainen et al. (2008) confirma a capacidade de modulação das respostas imunes específicas por parte do PCV2. Neste ensaio, dois grupos de animais foram imunizados contra o vírus da doença de Aujeszky (VDA), mas apenas um foi infectado por PCV2. Após estimulação com o VDA, detectaram-se elevadas quantidades de IFN- γ no sobrenadante da cultura celular proveniente dos animais imunizados não infectados por PCV2; contrariamente, nos animais infectados por PCV2, verificou-se uma inibição significativa da resposta IFN- γ contra o VDA ($P < 0,01$). O mesmo resultado foi obtido quando se pesquisou o efeito do PCV2 na síntese de IFN- α pelas PBMCs. A capacidade de produção de IL-10 pelas PBMCs foi também avaliada, tendo os resultados obtidos nos estudos anteriormente descritos sido validados, pois o PCV2 induziu uma produção substancial desta citocina imunossupressora em todos os animais estudados. Para além disso, a IL-10 interferiu activamente nas respostas de memória, inibindo a secreção de IFN- γ , IFN- α e IL-12. Adicionalmente, demonstrou-se que o PCV2 consegue inibir a produção de IL-2 através de um mecanismo IL-10 independente. Os dados obtidos confirmam a infecção por PCV2 como um factor impeditivo do desenvolvimento de respostas imunitárias adequadas, contribuindo para a imunossupressão e co-infecções verificadas nos animais afectados por PCV2-SD. Além do mais, a interferência com as respostas de memória observada neste estudo levantou a questão do potencial efeito negativo que as infecções por PCV2 poderão exercer no controlo vacinal de certas doenças, como confirmado noutros trabalhos (Opriessnig, McKeown, Harmon, Meng & Halbur, 2006a; Huang et al., 2011).

Chang et al. (2006) debruçaram-se também sobre os efeitos do PCV2 nos macrófagos alveolares (MA). Tal como nas CD, o antigénio e o genoma virais são identificáveis exclusivamente no seu citoplasma, sem qualquer sinal visível de replicação ou indução de morte celular. Contudo, a presença viral nos MA faz que estes exibam um prejuízo das suas capacidades funcionais, incluindo uma diminuição transitória das suas capacidades

fagocitárias e microbicidas, verificando-se a diminuição da produção de radicais livres de oxigénio e peróxido de hidrogénio, imprescindíveis para a sua capacidade citotóxica. Esta incapacidade funcional induzida pelo PCV2 pode tornar os suínos mais susceptíveis a infecções pulmonares oportunistas, dada a importância que os MA assumem na defesa pulmonar. Simultaneamente, regista-se uma produção aumentada de citocinas e quimiocinas, nomeadamente $\text{TNF-}\alpha$, IL-8, factores quimiotácticos derivados dos macrófagos alveolares (*alveolar macrophage-derived neutrophil chemotactic factors-II* - AMCF-II), factor estimulador de colónias de granulócitos (*granulocyte colony-stimulating factor* - G-CSF) e MCP-1. Uma vez que a superprodução destes compostos intensifica a dispneia e potencia a reacção inflamatória, recrutando células mononucleares fagocíticas, percebe-se o motivo da ocorrência de lesões de pneumonia intersticial em suínos que sofrem de PCV2-SD. Especula-se que, embora estas alterações possam representar um potencial dano para o tecido pulmonar e para a defesa pulmonar local, não se observa um efeito importante nos animais infectados somente pelo PCV2. Os efeitos tornam-se muito mais significativos conjuntamente com outros co-factores que favorecem o desenvolvimento de PCV2-SD, conduzindo os casos de infecção em direcção a doença clínica (Chang et al., 2006). Os conceitos abordados, baseados no estudo da imunomodulação pelo PCV2, encontram-se sumarizados na figura 7.

Figura 7. Imunopatogénese da infecção pelo PCV2 (Fonte: Summerfield, 2009)



2.6. Factores que influenciam a progressão da infecção por PCV2 para PCV2-SD

Actualmente reconhece-se que a PCV-SD é uma doença multifactorial na qual a infecção por PCV2 é essencial ao desenvolvimento e expressão da condição clínica (Opriessnig et al., 2007; Segalés et al., 2006). Contudo, o facto de quase todos os suínos do circuito comercial serem infectados pelo PCV2 num dado momento da sua vida e de o PCV2 estar presente em indivíduos e efectivos saudáveis, indica a necessidade de causas adicionais ou circunstâncias específicas que determinem o destino da infecção e despoitem o desenvolvimento da doença (Ellis et al., 2004). Na realidade, enquanto a grande maioria dos indivíduos se torna virémica, a prevalência de PCV2-SD é geralmente baixa, variando entre 4 e 30% (Segalés & Domingo, 2002). Vários factores que influenciam a progressão da infecção viral para PCV2-SD têm vindo a ser identificados, pelo que a patogénese da doença ainda não se encontra totalmente esclarecida.

A complexidade da PCV2-SD é sustentada pela ausência de um modelo experimental de doença universalmente reproduzível, pois a reprodução de PCV2-SD pelo uso isolado do vírus sem associação de outro co-factores (infecciosos ou não infecciosos) tem sido, na maioria dos casos, mal sucedida. Na maioria dos estudos experimentais a inoculação apenas com PCV2 origina infecções subclínicas, limitadas, não se detectando doença clínica acompanhada de sintomatologia evidente (Fort, 2009). No geral, a maioria dos investigadores concorda que a estimulação do sistema imunitário, *lato sensu*, é um acontecimento essencial ao desenvolvimento de PCV2-SD (Krakowka et al., 2001), pelo que, na patogénese da PCV2-SD, a virulência do PCV2 e a resposta imunitária do hospedeiro interactivam sob influência do património genético do suíno e de elementos ambientais. Dependendo da combinação destes factores, pode ocorrer infecção subclínica ou a morte (Darwich & Mateu, 2011).

2.6.1. Factores hospedeiro-dependentes

2.6.1.1. Género, idade e genética

As características intrínsecas do próprio animal desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença. Segundo Corregé, Pirouelle, Gaudré e Le Tiran (2001) e Rodríguez-Arriola et al. (2002), os machos castrados são consideravelmente mais susceptíveis do que as fêmeas, o que poderá atribuir-se a possíveis infecções secundárias derivadas da orquiectomia. No entanto, os autores supracitados consideram que as diferenças de susceptibilidade registadas poderão igualmente ser resultado da influência de factores hormonais e genéticos. De igual modo, o baixo peso à nascença, ao desmame e à entrada na engorda também parece relacionar-se com a frequência de ocorrência de PCV2-SD (Corregé et al., 2001). Mas, o baixo peso à nascença, mais que um factor adicional de vulnerabilidade, pode tratar-se de uma consequência precoce da doença. Pelo contrário, Madec et al. (2000) reportaram que a PCV2-SD pode ser identificada ao desmame quer em

suínos pesados, quer em suínos mais leves. Um forte “efeito de ninhada” foi também identificado, pois enquanto algumas ninhadas eram severamente dizimadas pela afecção, outras não exibiam efeitos adversos, facto atribuível à reprodutora e ao seu carácter de reservatório perante o PCV2 e outros agentes patogénicos frequentemente encontrados em explorações comerciais. Actualmente observa-se uma ausência de estudos referentes à influência da idade na infecção por PCV2. Em estudos experimentais as lesões associadas ao vírus são tipicamente observadas entre 14 a 35 dias p.i., o que sugere que os suínos em situações de campo serão provavelmente infectados entre a primeira e a décima semanas de idade, considerando o espectro de idades em que a doença se manifesta mais frequentemente (Iowa State University College of Veterinary Medicine, 2012).

Todas as raças suínas parecem ser susceptíveis à infecção, embora tenha sido advogado que certas linhas genéticas, particularmente no que se refere à linha do varrasco, sejam mais ou menos susceptíveis ao desenvolvimento de PCV2-SD. Vários estudos experimentais mostraram uma maior predisposição para a progressão de infecção subclínica para doença clínica na raça Landrace, comparativamente a Duroc, Large White e Pietrain (Langohr et al., 2010). Num estudo experimental em que se avaliou a susceptibilidade do hospedeiro e o seu efeito na resolução da infecção pelo PCV2, concluiu-se que, após infecção experimental com o PCV2, a incidência de doença sistémica associada a lesões microscópicas compatíveis com PCV2-SD foi de 0% em Duroc, 0% em Large White e 15,8% em Landrace (Opriessnig et al., 2006b). A mesma equipa demonstrou que os suínos de raça Landrace são também mais susceptíveis que os de raça Pietrain relativamente à gravidade das lesões linfóides microscópicas associadas ao PCV2 (Opriessnig et al., 2009b). López-Soria et al., (2011) relataram menor mortalidade pós-desmame, menor mortalidade associada a PCV2-SD e melhor evolução do peso corporal em leitões puros ou cruzados de Pietrain comparativamente a leitões resultantes do cruzamento Large White x Duroc. Todavia, e não obstante os resultados obtidos nos estudos abordados, o facto de suínos com idêntico património genético poderem exibir diferentes desfechos clínicos após inoculação experimental de PCV2 sugere a existência de variabilidade genética interindividual, tendo um estudo recente de genética molecular indicado que duas regiões do genoma suíno podem conter genes responsáveis por uma susceptibilidade aumentada à PCV2-SD (Karlskov-Mortensen et al. 2008, citado por Fort, 2009).

2.6.1.2. Resposta imunitária após infecção

Quando um suíno é exposto ao vírus, uma de três situações pode ocorrer: i) a infecção pelo PCV2 não acontece; ii) a infecção por PCV2 ocorre, mas detecta-se apenas uma pequena quantidade de vírus e não há desenvolvimento de doença clínica (infecção subclínica); ou iii) a infecção por PCV2 ocorre, seguida da acumulação de elevadas cargas virais e

desenvolvimento de PCV2-SD. Deste modo, nem toda a infecção garantirá que se observem graves perturbações imunopatológicas (Kekarainen et al., 2010). A capacidade de montar uma resposta imunitária eficaz face à infecção parece ser crítica, pois uma resposta imunitária enfraquecida conduzirá a uma situação de doença clínica (Fort, 2009). Alguns suínos são menos capazes de remover o vírus ou as células infectadas do seu organismo, o que pode explicar-se pela existência de diferenças na eficácia do sistema imunitário, resultando uma fracção limitada de animais mais susceptível à replicação viral e ao subsequente desenvolvimento de PCV2-SD (Meerts, 2005). No entanto, o desenvolvimento de doença clínica é o desfecho menos provável da infecção por PCV2, ficando o indivíduo, na maioria dos casos, apenas infectado subcl clinicamente.

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro contra os agentes patogénicos. A interacção PRR-patogénico induz a expressão de citocinas activadoras de processos inflamatórios imediatos e indutoras de respostas imunitárias adquiridas contra o organismo invasor. Fort et al. (2009a), após inoculação experimental com PCV2 de leitões privados de colostro e nascidos de cesariana, reportaram níveis detectáveis de IFN- α no soro de todos os indivíduos nos 5 dias p.i.. IFN- α é considerado uma citocina essencial para as defesas antivirais do hospedeiro, estando envolvido não só nas respostas inatas como na regulação da imunidade adquirida face a infecções virais. Considerando o envolvimento do PCV2 no bloqueio da indução de IFN- α nas NIPCs (Vincent et al., 2007), os hospedeiros capazes de enfrentar a infecção sem desenvolver doença clínica deverão conseguir contrariar a actividade inibitória do vírus, provavelmente por intermédio de fortes respostas inatas. A detecção precoce de IFN- α , sem desenvolvimento de sintomatologia clínica nos leitões do estudo de Fort et al. (2009a), indica que ocorreu o desenvolvimento de uma resposta imunitária inata contra o vírus, sugerindo que o equilíbrio entre a capacidade de o hospedeiro desenvolver uma resposta antiviral inata apropriada e a capacidade de o vírus a afectar pode ser determinante na evolução da infecção e desenvolvimento da doença.

A grande maioria dos estudos serológicos acerca da PCV2-SD baseia-se somente na detecção de anticorpos anti-PCV2 totais (*total antibodies* - TA), sem determinação da sua actividade neutralizante. Em condições de campo, observa-se uma seroconversão para TA tanto em suínos afectados subcl clinicamente como em suínos clinicamente doentes (Sibila et al., 2004; Grau-Roma et al., 2009). É provável que a produção de TA nos animais afectados por PCV2-SD ocorra antes do estabelecimento de um estado potencialmente imunossupressor. Todavia, alguns estudos experimentais detectaram ligeiras diferenças na seroconversão contra o PCV2 entre os dois grupos de animais, correlacionando-se estas com o aparecimento de PCV2-SD: os suínos clinicamente doentes tendem a exibir menores títulos de TA (Meerts et al., 2006; Fort et al., 2007). Este evento poderá ser explicado, em parte, pela deplecção linfocitária (especialmente de células B) observada nos indivíduos

com elevadas cargas virais nos tecidos linfóides e no sangue, sabendo-se que os linfócitos suportam a replicação do PCV2 (Yu et al., 2007). Além disso, estes animais exibem uma seroconversão mais tardia relativamente aos animais subcl clinicamente infectados (Meerts et al., 2006).

Vários estudos experimentais e de campo demonstraram que, para além de TA, os suínos infectados por PCV2 também desenvolvem NA específicos para o PCV2 (Meerts et al., 2005; Meerts et al., 2006; Fort et al., 2007). Os anticorpos neutralizantes possuem importantes funções de defesa contra as infecções virais na medida em que, desde o momento em que surgem, se ligam ao vírus e o neutralizam, prevenindo a disseminação adicional pelo organismo por impedimento de infecção de novas células. Em condições experimentais, os NA desenvolvem-se entre os dias 10 e 21 p.i. (Meerts et al., 2006; Fort et al., 2007). Meerts et al. (2006) relataram pela primeira vez a existência de uma correlação entre títulos de NA baixos ou inexistentes e o aumento da replicação do PCV2 com consequente desenvolvimento de PCV2-SD. Porém, apesar de os suínos com elevados níveis de replicação viral não terem produzido NA, exibiram uma seroconversão normal para TA, indicativa da produção de anticorpos contra o PCV2, mas não contra epítomos específicos envolvidos na neutralização do vírus por anticorpos. A maioria dos vírus possui um elevado número destes epítomos, pelo que a probabilidade de um indivíduo não reconhecer uma destas fracções pode ter consequências desastrosas. Quando os agentes envolvidos são vírus muito pequenos, como os circovírus, esta probabilidade aumenta consideravelmente, contribuindo para uma resposta ainda mais ineficaz por parte do sistema imunitário. Esta incapacidade de produção de NA desempenha um papel importante na progressão da infecção, pelo que elevados títulos de TA nem sempre são indicativos de uma boa imunidade protectora. Meerts et al. (2006) também estudaram a dinâmica dos NA em suínos infectados naturalmente, tendo demonstrado a existência de transmissão passiva de NA maternos aos leitões. Mais tarde, a seroconversão dos suínos infectados subcl clinicamente foi acompanhada de produção de NA, enquanto os que desenvolveram PCV2-SD nunca seroconverteram para NA (Meerts et al., 2006). Outro estudo demonstrou uma associação entre os títulos de NA e o estado clínico-patológico de animais infectados naturalmente, tendo os autores defendido que a incapacidade de produção de NA evidenciada por alguns suínos pode ser interpretada como uma causa ou como uma consequência do desenvolvimento de PCV2-SD (Fort et al., 2007). Neste ensaio, dois leitões inoculados experimentalmente com PCV2 que não desenvolveram virémia, apresentavam o título mais elevado de NA no dia da inoculação, permitindo concluir sobre o papel protector e neutralizante dos MDA. Regra geral, após inoculação experimental do vírus, a evolução dos títulos de NA acompanhou o curso dos TA, embora se tenha registado um ligeiro atraso na produção dos primeiros em alguns animais infectados subcl clinicamente (Fort et al., 2007).

A diminuição da virémia ocorre simultaneamente e apenas com o aumento dos títulos de NA, pelo que a neutralização da circulação viral mediada por anticorpos consiste num importante mecanismo de *clearance* e recuperação da infecção. Contudo, foi relatado um caso de coexistência de títulos de NA elevados e de cargas virais elevadas nos tecidos e no soro, sugerindo que a presença de anticorpos anti-PCV2 por si só não garante a *clearance* viral, e que estarão envolvidos outros mecanismos imunitários, para além das respostas humorais (Fort et al., 2007). Nas porcas, o papel dos NA também necessita ser clarificado, uma vez que é possível a detecção de PCV2 infeccioso no leite e colostro de reprodutoras naturalmente infectadas, mesmo na presença de elevados títulos de TA e NA no soro (Madson et al., 2009c).

O papel da imunidade celular no controlo da infecção por PCV2 e da progressão da doença tem sido progressivamente aprofundado. O facto de os indivíduos clinicamente doentes, com PCV2-SD, exibirem respostas celulares enfraquecidas como consequência da alteração do padrão de produção de citocinas nos tecidos linfóides e nas PBMCs, reflecte a sua contribuição para a imunidade protectora contra o PCV2 (Darwich et al., 2003a; Kekarainen et al., 2008). A título de exemplo, o tratamento de leitões gnotobióticos com ciclosporina, fármaco responsável pela inibição da proliferação de células T, resultou num aumento da replicação viral (Meerts et al., 2005). Fort et al. (2009a; 2009b) descreveram o desenvolvimento de células secretoras de IFN- γ (*IFN- γ -secreting cells* - IFN- γ -SC) em resposta à infecção por PCV2. O desenvolvimento de IFN- γ -SC coincidiu com o decréscimo da virémia, sugerindo que as respostas mediadas por células, juntamente com o desenvolvimento de NA, contribuem para a *clearance* viral. Os mesmos autores reportaram que esta resposta se encontra, aparentemente, relacionada com a carga e a extensão da replicação viral, uma vez que em suínos nos quais a carga viral é baixa, as IFN- γ -SC são escassas ou indetectáveis. Pelo contrário, indivíduos com elevados níveis de virémia e lesões consistentes com replicação viral desenvolvem frequências mais elevadas de IFN- γ -SC. Meerts et al. (2005) também relataram que níveis de expressão de IFN- γ elevados se correlacionam com uma menor susceptibilidade à replicação do PCV2. Além disso, uma vez que IFN- γ é produzido após activação de células Th1, a sua transcrição num hospedeiro infectado pode utilizar-se como marcador do início da resposta imunitária celular contra a infecção.

2.6.2. Estatuto imunitário e infeccioso da porca

A presença de anticorpos anti-PCV2 adquiridos passivamente no momento da exposição ao vírus é um factor importante a tomar em consideração, dado que vários estudos realizados em suínos natural ou experimentalmente infectados têm revelado que a replicação viral e a expressão de PCV2-SD podem ser altamente influenciadas pela sua presença. A meta-análise de infecções experimentais indicou que os leitões privados de colostro são muito

mais susceptíveis ao desenvolvimento de PCV2-SD (Tomás et al., 2008). Num estudo longitudinal realizado em explorações espanholas e dinamarquesas concluiu-se que os leitões saudáveis exibem títulos de MDA superiores numa idade mais precoce que os leitões que futuramente virão a desenvolver a doença (Grau-Roma et al., 2009). Calsamiglia et al. (2007), com o intuito de avaliar a mortalidade dos leitões, relacionando-a com algumas variáveis atribuíveis às porcas, estudaram sete explorações afectadas por PCV2-SD; os resultados obtidos revelaram uma mortalidade mais elevada em leitões provenientes de porcas com menor título de anticorpos anti-PCV2 comparativamente a leitões de porcas com um título mais elevado (39% contra 18%), reforçando o efeito protector dos MDA. O mesmo estudo evidenciou uma relação entre a virémia da porca e a mortalidade dos leitões, dado que morreram mais leitões por ninhada de porcas virémicas comparativamente a porcas não virémicas. Estes dados suportam o “efeito de ninhada” descrito por Madec et al. (2000), embora Calsamiglia et al. (2007) sugiram como alternativa o termo “efeito da porca” para se referirem ao facto de o estatuto sanitário e serológico da porca exercer um efeito significativo na mortalidade das ninhadas de explorações afectadas por PCV2-SD.

2.6.3. Momento da infecção

Sabe-se que nas explorações afectadas por PCV2-SD se encontra uma maior seroprevalência em suínos mais jovens. Esta afirmação baseia-se num estudo de caso-controlo no qual nas explorações afectadas pela doença, mais de 90% dos animais com 12 semanas de idade já tinha seroconvertido face ao vírus ($P=0,02$). Os dados obtidos sugerem que, quanto mais cedo ocorrer infecção por PCV2, mais elevado o risco de desenvolvimento de PCV2-SD (López-Soria et al., 2005). Tomás et al. (2008) estabeleceram que é impossível a indução experimental de PCV2-SD em suínos com mais de 6 semanas de idade. Assim, as PCVD estarão mais relacionadas com as primeiras semanas de vida do leitão, pois é nestas que é mais provável a ocorrência de danos no sistema imunitário. Ao penetrar no organismo do leitão, o vírus é capturado por células nas quais persiste durante longos períodos de tempo, escapando à degradação e processamento pelo sistema imunitário. Mais tarde, durante a vida produtiva, à medida que o animal é perturbado por um conjunto de diferentes co-factores e a imunidade de origem materna decai, o PCV2 silencioso pode ser reactivado. Nos indivíduos marcadamente imunocomprometidos registam-se elevados níveis de multiplicação e excreção, podendo ocorrer morte; outros podem apenas ser afectados subcl clinicamente.

2.6.4. Factores vírus-dependentes

Actualmente regista-se uma verdadeira controvérsia em redor desta temática, já que os diversos estudos realizados exibem resultados contraditórios. O facto de o vírus poder ser

detectado simultaneamente em explorações e suínos afectados e não afectados por PCV2-SD levantou a questão da existência de vários isolados que variam em patogenicidade. De modo a identificar os determinantes genéticos da virulência e da replicação do PCV2, Fenaux, Opriessnig, Halbur, Elvinger e Meng (2004a) inocularam experimentalmente 11 suínos *specific pathogen free* (SPF) com o vírus sujeito a 120 passagens numa cultura celular. Estes animais evidenciaram uma menor virémia e uma menor gravidade das lesões macroscópicas e histopatológicas associadas ao PCV2 que os 10 suínos SPF inoculados com o vírus selvagem. As diferenças registadas foram atribuídas a duas mutações em aminoácidos da proteína Cap, sugerindo que alterações mínimas no genoma do PCV2 podem alterar marcadamente a sua virulência e patologia associada. Pensa-se que o genótipo do PCV2 pode influenciar a progressão da infecção viral. De qualquer das formas, é necessário considerar que a reprodução experimental da doença foi possível com os genótipos PCV2a e PCV2b, embora o último tenha exibido uma maior eficácia (Tomás et al., 2008). Além disso, um estudo no qual se comparou a virulência entre ambos os genótipos não foi bem sucedido pois, para além de não ter sido registada doença clínica evidente, não se observaram diferenças significativas entre a gravidade das lesões associadas ao PCV2 e a quantidade de antigénio viral nas mesmas entre suínos inoculados com PCV2a e PCV2b. Todavia, verificaram-se diferenças ao nível da virulência entre isolados dentro dos genótipos considerados (Opriessnig et al., 2008a).

2.6.5. Co-infecções e imunomodulação

A co-infecção com outros agentes patogénicos bacterianos e virais suínos reflecte-se, regra geral, num aumento da incidência e numa evolução mais severa da PCV2-SD (Gillespie et al., 2009). Como referido anteriormente, na maioria das vezes a inoculação experimental apenas com PCV2 resulta em infecções subclínicas; as hipóteses de obter doença clínica aumentam em combinação com outro agente patogénico suíno (Fort, 2009). A meta-análise de vários casos experimentais de infecção confirmou o papel das co-infecções como factor despoletador em episódios de infecção bem sucedidos (Tomás et al., 2008) e vários estudos de campo demonstram que os suínos afectados por PCV2-SD sofrem de um amplo espectro de infecções e/ou doenças concomitantes (Tabela 4). Esta constatação levanta a questão sobre se a presença habitual de co-infecções em explorações e suínos atingidos pela doença funcionará como um despoletador de PCV2-SD ou, pelo contrário, se a mesma resultará do estado imunossupressivo conferido pela afecção (López-Soria et al., 2008). Pallarés et al. (2002) sumarizaram as co-infecções mais frequentes em indivíduos acometidos de PCV2-SD, nos EUA: o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (*porcine reproductive and respiratory syndrome virus* - PRRSV) foi detectado em 52%, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) em 36% e o vírus da gripe suína (*swine influenza virus* -

SIV) em 5,4% dos casos. A infecção isolada por PCV2 foi detectada em apenas 2% dos animais.

Tabela 4. Agentes de co-infecção reportados em casos naturais de PCV2-SD (Adaptado de Pallarés et al., 2002, Grau-Roma et al., 2011 e Opriessnig & Halbur, 2012)

	Agente
Vírus	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV)
	Parvovírus porcino (PPV)
	Vírus da diarreia epidémica porcina (PEDV)
	Vírus da doença de Aujeszky (ADV)
	Vírus da hepatite E (HEV)
	Teschovírus porcino (PTV)
	Vírus da gripe suína (SIV)
Mycoplasmas	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
	<i>Mycoplasma suis</i>
Bactérias	<i>Streptococcus suis</i>
	<i>Pasteurella multocida</i>
	<i>Salmonella choleraesuis</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Haemophilus parasuis</i>
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
	<i>Actinobacillus suis</i>
	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
Agentes patogénicos oportunistas	<i>Pneumocystis carinii</i>
	<i>Candida albicans</i>
	<i>Aspergillus</i> spp.
	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	<i>Chlamydia</i> spp.
	<i>Zygomycetes</i> spp.

Dos vários agentes de co-infecções descritos na literatura, o que representará um factor de risco mais elevado para o desenvolvimento de PCV2-SD tratar-se-á do PRRSV (Pogranichniy, Yoon, Harms, Sorden & Daniels, 2002). Os autores deste estudo de caso-controlo apuraram que, em média, os animais infectados simultaneamente pelo PCV2 e pelo PRRSV exibem 31,2 vezes mais hipóteses de desenvolver PCV2-SD (Odds Ratio=31,2; P=0,0009). O PRRSV é responsável pelo aumento da carga viral no soro e de antígeno viral nos tecidos de suínos alvos de co-infecção, o que culminará com lesões associadas ao PCV2 mais severas e representará uma maior probabilidade de desenvolvimento de manifestações clínicas da doença (Opriessnig et al., 2008d). Além do mais, a co-infecção com PRRSV foi implicada na alteração de expressão de citocinas pelas PBMCs, resultando numa imunomodulação que contribui para uma virémia mais elevada e persistente associada a uma seroconversão mais lenta e menos eficaz, contribuindo para uma PCV2-SD mais severa (Shi, Guo, Ge, Liu & Yang, 2010). Um estudo retrospectivo

norte-americano que analisou casos naturais de PCV2-SD reportou que os animais infectados simultaneamente por PCV2 e PRRSV exibiam doença clínica mais precocemente que os restantes indivíduos (antes das 5 semanas de idade), sugerindo que o PRRSV poderá potenciar a replicação do PCV2 (Pallarés et al., 2002).

Outros agentes de co-infecção importantes incluem o parvovírus porcino (*porcine parvovirus* - PPV) e Mh, com os quais o PCV2 parece também partilhar um aparente sinergismo, aumentando a gravidade dos sinais clínicos e das lesões de PCV2-SD (Ellis et al., 2004). A base desta sinergia deverá envolver a activação e a potenciação da replicação viral em macrófagos e outras células-alvo (Krakowka et al., 2001; Ellis et al., 2004).

Vários estudos evidenciam o papel da imunoestimulação no desenvolvimento de doença clínica acompanhada de lesões características, após infecção por PCV2. Krakowka et al. (2001) inocularam leitões gnotobióticos com o vírus e com um imunogénio não infeccioso irrelevante (*keyhole limpet hemocyanin* - KLH) emulsificado em adjuvante de Freund incompleto. Após a injeção subcutânea, avaliou-se a carga viral nos linfonodos regionais. A imunoactivação resultou num número elevado de células antigénio-positivas e de vírus infeccioso nos linfonodos drenantes, compatível com o quadro clínico de PCV2-SD, algo não observável nos leitões não estimulados, que exibiram apenas infecção subclínica. Investigações adicionais sugeriram que a replicação do vírus foi potenciada pela imunoestimulação, resultando numa massiva activação de certos tipos celulares, nomeadamente dos macrófagos dos tecidos linfóides (Krakowka et al., 2001). Com base neste trabalho, realizaram-se vários estudos sobre o efeito de vacinas adjuvadas na potenciação da doença, suportando que, sob determinadas condições, aquelas podem potenciar a replicação viral e aumentar a gravidade das lesões e dos sinais clínicos de PCV2-SD. Num destes estudos sugeriu-se que este efeito imunoestimulante na replicação do PCV2 poderá estar dependente do momento de aplicação da vacina, tendo sido observado que o efeito deletério da vacinação para Mh pode ser minimizado ou eliminado ao realizá-la 2 a 4 semanas antes da exposição prevista ao PCV2 (Opriessnig et al., 2006c). Segundo Hoogland, Opriessnig e Halbur (2006), os médicos veterinários e os produtores deverão ponderar os benefícios da vacinação contra agentes patogénicos concomitantes e o potencial efeito negativo que certas vacinas podem exercer na replicação do PCV2. Os autores verificaram que os animais vacinados com o mesmo antigénio e com um adjuvante oleoso solúvel em água evidenciaram uma virémia mais prolongada, maiores cargas virais no soro e nos tecidos e lesões linfóides mais graves comparativamente a animais vacinados com produtos aquosos ou hidróxido de alumínio. Com base nos dados dos estudos acima descritos, pode concluir-se que os tecidos linfóides estimulados (quer por infecções concomitantes, quer por outros factores imunoestimulantes) representam um ambiente óptimo para a replicação do PCV2 (Fort, 2009).

Os efeitos da imunossupressão na doença causada pelo PCV2 foram também avaliados. A indução de um estado imunossupressor através da injeção de ciclosporina em suínos infectados experimentalmente com PCV2 resultou num aumento da replicação viral tecidual, como resultado da supressão da resposta imunitária adquirida; estes indivíduos exibiram um atraso na produção de anticorpos anti-PCV2 e baixos níveis de NA comparativamente ao grupo controlo, infectado mas não inoculado com o fármaco imunossupressor (Meerts et al., 2005).

2.6.6. Maneio

Vários factores relacionados com o maneio na exploração têm sido implicados no aumento do risco de PCV2-SD por despoletarem uma replicação viral massiva (tanto directa como indirectamente). No entanto, não existem dados científicos objectivos que permitam concluir como poderão as medidas de maneio influenciar o aparecimento da doença. Estes factores incluem² (Rose et al., 2003 ; López-Soria et al., 2005 ; Martineau & Morvan, 2010 ; Rose et al., 2012):

- i) Alojamento: parques grandes na recria, proximidade a outras explorações e fossas comuns a várias salas de engorda revelaram-se factores de risco;
- ii) Protocolos vacinais: a vacinação de marrãs contra PRRSV, a vacinação das porcas contra *Escherichia coli* e o uso separado de vacinas contra *Erysipelothrix rhusiopathiae* e PPV em marrãs revelaram-se factores de risco, enquanto a vacinação das porcas contra a rinite atrófica se demonstrou protectora;
- iii) Higiene e maneio: reduzidos períodos de vazio sanitário na recria e na maternidade, adopções na maternidade e mistura de grupos aquando da entrada na recria, desmame precoce (<21 dias), compra de marrãs, sêmen proveniente dos varrascos presentes na exploração e reprodutoras em más condições (excesso de abcessos devido a más técnicas de injeção e escassos tratamentos contra ectoparasitas) revelaram-se factores de risco;
- iv) Biossegurança: existência de duche na exploração e evitar contactar com suínos dias antes da visita à exploração revelaram-se protectores.

2.7. Quadro clínico e lesional

A morbilidade nas explorações afectadas pela doença situa-se entre 4 e 30% (ocasionalmente 50 a 60%) (Segalés & Domingo, 2002), estando associada ao desenvolvimento de virémia e linfopénia, seguidas de manifestações clínicas de doença (Gillespie et al., 2007). A mortalidade situa-se geralmente nos 10%, embora varie entre os 4 e os 20% (Segalés & Domingo, 2002) podendo, em casos particulares, atingir os 50% (Allan & Ellis, 2000). Devido ao carácter prolongado da afecção e à diminuição da eficiência produtiva, estima-se que cerca de 70 a 80% dos animais que desenvolvam PCV2-SD sejam

² Alguns destes factores, apesar de estatisticamente significativos nos estudos de origem, podem não exercer um efeito real no desenvolvimento de doença.

eutanasiados (Segalés & Domingo, 2002). O sinal clínico mais característico consiste em emagrecimento com progressiva perda de peso até uma magreza acentuada. Os suínos afectados podem também exibir letargia, palidez, dispneia e tosse, diarreia de cor escura e, ocasionalmente, icterícia (Rosell et al., 1999; Segalés & Domingo, 2002; Opriessnig et al., 2007; Gillespie et al., 2009). A severidade e o tipo de expressão da doença podem variar consideravelmente entre suínos de um mesmo grupo pelo que, enquanto alguns indivíduos se encontram gravemente afectados, outros não exibem qualquer sinal óbvio de doença.

Existe um largo espectro de lesões inespecíficas que pode estar presente em vários tecidos de suínos afectados por PCV2-SD. À necrópsia, as alterações mais visíveis consistem em pulmões não colapsados de aspecto mosqueado, lesões que, microscopicamente, correspondem a pneumonia intersticial; e hipertrofia dos linfonodos (principalmente os superficiais inguinais, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos), um acontecimento muito comum nas fases iniciais da doença sistémica (Rosell et al., 1999; Segalés et al., 2004; Segalés et al., 2006). Linfonodos normais ou até atroficos são mais comumente observados em fases mais avançadas da afecção (Rosell et al., 1999). O timo encontra-se frequentemente atrofiado em indivíduos doentes, resultado de uma atrofia cortical acompanhada de depleção linfocitária (Darwich et al., 2003a). Uma pequena proporção de linfonodos pode exibir áreas de necrose multifocal visíveis macroscopicamente, correspondentes microscopicamente a zonas de necrose coagulativa multifocal a coalescente associada a trombose vascular (Rosell et al., 1999; Segalés & Domingo, 2002).

Por vezes, na ausência de doença clínica, a infecção pode limitar-se a um ou dois linfonodos, podendo suínos saudáveis exibir linfadenite necrótica (Opriessnig, Janke & Halbur, 2006d). Em casos crónicos, os rins podem apresentar múltiplos focos de descoloração de dimensões variáveis, coincidentes com lesões de nefrite intersticial não purulenta (Rosell et al., 1999; Segalés et al., 2004; Segalés et al., 2006; Opriessnig et al., 2007). Em alguns casos, pode observar-se aumento ou diminuição do tamanho do fígado, que pode apresentar-se pálido e firme, com uma superfície granulosa fina que corresponde, microscopicamente, a alterações citopáticas disseminadas e inflamação; neste estadio pode ocorrer icterícia generalizada (Rosell et al., 1999; Segalés et al., 2004; Segalés et al., 2006). Podem registar-se também lesões de enterite catarral com ou sem edema, reflexo de lesões microscópicas de enterite granulomatosa (Segalés, 2012). Números moderados a elevados de suínos afectados por PCV2-SD podem exibir broncopneumonia e ulceração gástrica na zona da *pars oesophagea*. Estas condições não estão directamente relacionadas com o PCV2, mas com infecções bacterianas e origens multifactoriais, respectivamente. As lesões gástricas podem causar graves hemorragias internas, ditando a morte de alguns indivíduos e contribuindo para a palidez (anemia) observada (Rosell et al., 1999; Segalés et al., 2004). Os suínos cronicamente afectados podem desenvolver caquécia, com marcada perda de massa muscular e atrofia serosa da gordura (Segalés et al., 2004).

A PCV2-SD caracteriza-se por lesões inflamatórias linfohistiocíticas a granulomatosas nos tecidos linfóides e/ou pulmões, fígado, rim, coração e intestinos (Opriessnig et al., 2007). Contudo, contrariamente às lesões macroscópicas e microscópicas observadas nos órgãos não linfóides, inespecíficas e variáveis, as lesões microscópicas linfóides associadas ao PCV2 são quase únicas. Pode observar-se sistematicamente um grau variável de depleção linfocitária com perda da arquitectura folicular, geralmente combinado com infiltração histiocítica multifocal a difusa, ligeira ou muito intensa, e possível presença de células gigantes (Rosell et al., 1999; Segalés et al., 2004). Outra descoberta comum é a presença de inclusões citoplasmáticas basofílicas de PCV2 em histiócitos ou CD dos tecidos linfóides. Rosell et al. (1999) indicam que, enquanto a infiltração histiocítica ou de células gigantes multinucleadas nos tecidos consiste num evento precoce de PCV2-SD, a depleção linfóide grave e as lesões hepáticas e renais parecem ser eventos mais tardios da doença. A gravidade destas lesões encontra-se directamente relacionada com o estadio da doença, pelo que os suínos clinicamente doentes podem ser diferenciados dos infectados subcl clinicamente pela intensidade das lesões associadas ao PCV2 (Segalés et al., 2004; Opriessnig et al., 2007). Foram recentemente descritas lesões associadas à infecção por PCV2 que indiciam um papel importante do sistema cardiovascular e das células endoteliais na patogénese da doença. Opriessnig et al. (2006d) descreveram casos de insuficiência cardíaca derivados de miocardite necrótica ou fibrosante, associada a vasculite crónica no coração, rins e tecidos linfóides em leitões de recria; o antígeno viral foi detectado no citoplasma e no núcleo dos cardiomiócitos e das células endoteliais do miocárdio. Também se observaram quadros de vasculite linfohistiocítica em suínos alvo de PCV2-SD induzida experimentalmente (Opriessnig et al., 2006d; Langohr et al., 2010).

Podem detectar-se focos de infiltrados inflamatórios linfohistiocíticos em virtualmente todos os tecidos, embora numa menor extensão que nos órgãos supracitados (Segalés & Domingo, 2002; Segalés, 2012).

O hemograma de suínos com PCV2-SD evidencia alterações significativas (Segalés, Pastor, Cuenca & Domingo, 2000). Em indivíduos doentes, o número de linfócitos encontra-se significativamente diminuído e os monócitos e neutrófilos aumentados, observando-se uma inversão do rácio linfócito/neutrófilo. O aumento do número de monócitos poderá estar associado ao aumento ou proliferação das células da linhagem monocítica, possivelmente induzidos pelo vírus, podendo igualmente reflectir-se no aumento de macrófagos, que infiltram os tecidos alvos. Os suínos com PCV2-SD exibem geralmente uma anemia microcítica hipocrómica compatível com perda de sangue e ferro, que ocorre frequentemente em casos de úlceras gastroentéricas. Estes dados sugerem que a palidez e a anemia observáveis em suínos doentes parecem estar associadas à presença das úlceras gástricas e não à infecção viral (Segalés et al., 2000).

2.8. Diagnóstico

O primeiro passo do diagnóstico deverá envolver a observação de sinais clínicos. O amplo espectro de possíveis manifestações clínicas de PCV2-SD é pouco específico, pelo que devem estabelecer-se diagnósticos diferenciais dependendo dos sinais clínicos dominantes. Além disso, a existência de um número significativo de afecções associado a emagrecimento, o principal sinal clínico nos animais afectados, dificulta o diagnóstico.

2.8.1. Diagnóstico individual e de exploração

O diagnóstico de infecção subclínica implica que, embora o PCV2 seja detectado no sangue e/ou tecidos, a carga viral seja baixa, estando associada a lesões mínimas ou ausentes (Opriessnig et al., 2007). Apesar de não se observarem sinais clínicos explícitos, vários estudos indicam que a vacinação contra o PCV2 melhora a eficiência produtiva em cenários de infecção subclínica pelo vírus (Laza et al., 2011; Venegas-Vargas et al., 2011), pelo que o uso de vacinas comerciais parece constituir um passo fulcral no diagnóstico de infecção subclínica (Segalés, 2012).

Embora a observação de emagrecimento e dispneia numa fracção de suínos na fase final da recria e período inicial da engorda possa ser sugestiva de PCV2-SD, os sinais clínicos e as lesões macroscópicas *post-mortem* observados não são suficientes para estabelecer um diagnóstico definitivo (Segalés et al., 2006; Grau-Roma et al., 2011). Uma vez que o PCV2 é ubiquitário na população suína e que infecção não significa necessariamente ocorrência de doença, considera-se que um indivíduo sofre de PCV2-SD quando preenche os três seguintes requisitos (Sorden, 2000): i) presença de sinais clínicos compatíveis, incluindo emagrecimento e atraso do crescimento; ii) presença de lesões histopatológicas moderadas a graves nos tecidos linfóides (deplecção linfocitária e infiltração granulomatosa) e inflamação granulomatosa de outros tecidos; iii) detecção de quantidades moderadas a elevadas de PCV2 nos tecidos afectados.

Dos vários métodos desenvolvidos para detecção de PCV2 nos tecidos e sua relação com a presença de lesões, destacam-se a ISH e a imunohistoquímica (*immunohistochemistry* - IHC). Estes métodos permitem evidenciar a existência de uma forte correlação entre a quantidade de ácido nucleico ou antigénio virais com a gravidade das lesões microscópicas (Rosell et al., 1999; Quintana et al., 2001; Darwich et al., 2004; Krakowka et al., 2005). Em animais saudáveis, infectados subclínicamente, é possível detectar pequenas quantidades de antigénio ou ácido nucleico virais e lesões microscópicas ligeiras (Quintana et al., 2001; Segalés, 2012). Também suínos recentemente infectados ou em convalescença após PCV2-SD podem exhibir lesões ligeiras a ausentes nos tecidos linfóides, assim como baixas quantidades de antigénio ou ácido nucleico virais (Quintana et al., 2001). A taxa de recuperação em animais que desenvolvem PCV2-SD pode chegar a cerca de 20% (Quintana et al., 2001). Estes pressupostos são importantes quando se seleccionam as

amostras para análise. O diagnóstico de PCV2-SD exige uma selecção cuidada dos animais e das amostras; se o exame do animal não for possível, os principais tecidos a colher serão órgãos linfóides (particularmente, amígdala, 2 ou 3 linfonodos, íleo e baço), podendo também optar-se pela colheita de amostras de pulmão, fígado, rim e cólon, embora a detecção de PCV2 nos mesmos não seja específica para o diagnóstico de PCV2-SD (Segalés, 2002; Iowa State University College of Veterinary Medicine, 2012).

Uma vez que podem ser diagnosticados casos individuais em efectivos com excelentes desempenhos produtivos, o Consórcio Europeu para a Investigação das PCVD (*European Union Consortium on PCVD Research*) (2005) propôs a definição de um diagnóstico de exploração (www.pcvd.eu), segundo o qual uma exploração afectada por PCV2-SD deve satisfazer os seguintes critérios:

- i) Observação de um aumento significativo da mortalidade e do emagrecimento no pós-desmame comparativamente ao histórico normal da exploração. O aumento da mortalidade é considerado significativo quando a mortalidade actual (durante um período de 1 a 2 meses) é igual ou superior à mortalidade média histórica (durante um período mínimo de 3 meses) mais 1,66 vezes o desvio-padrão; em alternativa, o aumento da mortalidade pode ser determinado estatisticamente, utilizando o teste de qui-quadrado. Se não se encontrarem disponíveis registos de mortalidade da exploração, o aumento da mortalidade deve ultrapassar o nível nacional ou regional em 50%;
- ii) O diagnóstico individual deve ser estabelecido em pelo menos um de cinco suínos necropsiados.

Além disso, outros procedimentos diagnósticos podem e devem ser levados a cabo de modo a excluir outras potenciais causas de mortalidade elevada.

2.8.2. Métodos de detecção de ácido nucleico e antigénio virais e anticorpos anti-PCV2

A IHC e a ISH, que detectam, respectivamente, antigénio e ácido nucleico virais, são as técnicas mais utilizadas no diagnóstico de PCV2-SD, dando origem a resultados semelhantes (Rosell et al., 1999; Sorden, 2000). Contudo, outras técnicas de diagnóstico têm sido descritas na literatura, entre as quais se destaca a PCR, que permite a detecção de ácido nucleico viral e possui a vantagem de poder ser aplicada a uma grande variedade de amostras (soro, excreções e secreções e tecidos). No entanto, por ser demasiado sensível, a PCR não permite a distinção entre infecções clínicas e subclínicas (Opriessnig et al., 2007). Considerando que as infecções subclínicas são muitíssimo comuns e que a infecção por PCV2 só se manifesta clinicamente sob determinadas condições, os métodos de PCR não quantitativos não devem ser utilizados no diagnóstico de PCV2-SD. Tendo em conta a forte correlação existente entre a quantidade de antigénio e/ou ácido nucleico e a gravidade das lesões histopatológicas, a PCR quantitativa (qPCR) demonstra possuir um valor

preditivo da evolução clínica, podendo ser útil a investigadores e clínicos de campo (Opriessnig et al., 2007). Vários autores têm sugerido valores para os limiares de detecção de PCV2-SD em animais vivos utilizando técnicas de qPCR em amostras facilmente colectáveis, em combinação ou não com técnicas de diagnóstico serológico: $10^{6,21}$ (Grau-Roma et al., 2009), $10^{6,91}$ (Fort et al. 2007) e 10^7 (Olvera, Sibila, Calsamiglia, Segalés & Domingo, 2004; Martelli et al., 2011) cópias virais/ml. As variações observadas derivam, sobretudo, dos laboratórios e dos protocolos utilizados. No geral, considera-se que um limiar igual ou superior a 10^7 cópias virais/ml de soro se correlaciona positivamente com lesões e doença associadas ao PCV2 e a um pior prognóstico. A qPCR pode ser utilizada na diferenciação precisa entre infecção por PCV2 e PCV2-SD, baseando-se na quantidade de vírus presente (Opriessnig et al., 2007). Deste modo, os resultados podem corresponder a suínos negativos; subclínicamente infectados ($< 10^5$ a 10^6 cópias/ml); suspeitos (entre 10^6 e 10^7 cópias/ml); ou positivos, com PCV2-SD ($\geq 10^7$ cópias/ml) (Olvera et al., 2004; Opriessnig et al., 2007; Martelli et al., 2011). Todavia, apesar de úteis no refinamento do diagnóstico de PCV2-SD, estas técnicas nunca poderão ser utilizadas como alternativa à histopatologia e à detecção de PCV2 nos tecidos.

Os testes serológicos, incluindo IPMA, imunofluorescência indirecta (*indirect fluorescent antibody assay* - IFA) e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são maioritariamente utilizados no efectivo, com o objectivo de determinar o momento da infecção ou aferir sobre a vacinação, possuindo reduzido valor diagnóstico. A grande maioria destes testes foi, na realidade, desenvolvida por grupos de investigação como forma de monitorização da infecção por PCV2 em estudos experimentais e epidemiológicos. Mas a ubiquidade do vírus e o padrão de seroconversão similar entre explorações afectadas e não afectadas por PCV2-SD, torna muito difícil o uso de técnicas serológicas no diagnóstico da doença (Segalés & Domingo, 2002; Segalés et al., 2006). Ainda assim, populações *naïves* susceptíveis a PCV2-SD, como jovens varrascos de centros de inseminação, podem beneficiar da realização destas técnicas (Opriessnig et al., 2007). Nos últimos anos tem-se assistido à comercialização de testes de diagnóstico variantes de ELISA, nomeadamente ELISAs para IgG e IgM, cujos valores podem ser úteis na determinação do momento de infecção pelo PCV2 (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de IgG e IgM para determinação do momento de infecção pelo PCV2 (Fonte: Segalés et al., 2005 citado por Opriessnig et al., 2007)

Valor	Estado clínico
IgM \geq IgG	Início de infecção activa (primeiros 21 dias pós-infecção)
IgM $<$ IgG	Infecção activa (entre 20 a 50 dias pós-infecção)
IgG elevado e IgM negativo	Fase tardia da infecção ou fase de convalescença (aproximadamente 2 meses após infecção)

Saliente-se também a existência de um teste de ELISA competitivo (de bloqueio) que permite a detecção de anticorpos específicos para PCV2 nas fezes (Synbiotics Europe SAS, 2010). Recentemente, desenvolveram-se testes que permitem a detecção de NA em combinação com qPCR, que se crê serem úteis na exclusão do diagnóstico de PCV2-SD (Meerts et al., 2005; Fort et al., 2007). Outros testes diagnósticos incluem o isolamento do vírus e a microscopia electrónica (Opriessnig et al., 2007; Gillespie et al., 2009). Não existem, actualmente, testes de campo que permitam o diagnóstico inequívoco de PCV2-SD (Gillespie et al., 2009).

Presentemente, regista-se uma tendência para a vacinação massiva contra o PCV2, quer em explorações clinicamente afectadas, quer em infectadas subcl clinicamente, pelo que o diagnóstico laboratorial previamente à vacinação não terá grande interesse. O interesse em estabelecer um diagnóstico laboratorial será maior em situações nas quais: i) existem sinais clínicos sugestivos de PCV2-SD em suínos vacinados contra o PCV2; e ii) os resultados obtidos após a vacinação contra o PCV2 ficaram aquém do esperado. Segalés (2007; 2012) defende que as vacinas comerciais nunca foram aplicadas em cenários de epizootia e que, portanto, em circunstâncias diferentes, os clínicos devem estar consciencializados que as vacinas “podem não funcionar como esperado” ou “podem falhar”.

2.9. Prevenção e controlo

Antes do desenvolvimento de vacinas contra o PCV2, e uma vez que a PCV2-SD é uma doença de natureza multifactorial, as medidas de tratamento e controlo focavam-se maioritariamente na minimização e/ou eliminação de factores de risco envolvidos na sua progressão. Nesse sentido, foi sugerido um plano de 20 pontos que ajudasse os produtores na identificação e ajustamento das práticas de manejo que favorecem a doença (Madec et al., 2000). Estas recomendações focam-se principalmente na redução da pressão de infecção por PCV2 ou outros agentes e na minimização do *stress*. Os principais pontos do “plano dos 20 princípios de Madec” incluem a optimização das condições de higiene através da implementação de protocolos de limpeza e desinfecção adequados, a limitação do contacto entre animais (sobretudo entre indivíduos provenientes de diferentes ninhadas), a redução do *stress*, o isolamento imediato ou eutanásia dos suínos doentes, a manutenção de ventilação, temperatura ambiente e densidade animal apropriadas, uma boa nutrição e a realização de tratamentos antiparasitários e vacinação adequados.

Dados derivados de ensaios de campo e experimentais revelaram que o diagnóstico e o controlo das co-infecções de natureza viral ou bacteriana, comumente registadas em suínos afectados por PCV2-SD, são úteis na diminuição da incidência da infecção, melhorando o prognóstico e o desempenho produtivo (Rose et al., 2003; López-Soria et al., 2005; Segalés et al., 2006; Opriessnig et al., 2007; Gillespie et al., 2009). Contudo, há que acautelar a utilização de vacinas no controlo destes agentes, dado que a imunoactivação daí

decorrente, por poder ser um factor despoletador de PCV2-SD, pode acarretar potenciais consequências negativas (Hoogland et al., 2006; Opriessnig et al., 2006c).

Tendo sido descrita a ocorrência de um aumento da mortalidade geral na descendência de porcas infectadas ou com baixos títulos de anticorpos anti-PCV2 (Calsamiglia et al., 2004), a implementação de medidas que aumentem a imunidade materna e diminuam a virémia das reprodutoras poderá melhorar a mortalidade dos leitões em efectivos afectados por PCV2-SD (Segalés et al., 2006).

Dadas as aparentes diferenças de susceptibilidade entre diversas raças e linhas genéticas (Opriessnig et al., 2006b; Opriessnig et al., 2009b; López-Soria et al., 2011), alterações ao nível da linhagem de varrascos poderão ser úteis em casos de efectivos severamente afectados pela doença. Embora a detecção de PCV2 no sémen não seja uma prova definitiva de infecção pela via vertical, a demonstração da sua capacidade infectiva indica que a transmissão é possível (Madson et al., 2009a), pelo que os centros de inseminação artificial deverão centrar-se no uso de varrascos livres de agentes patogénicos e na manutenção de condições de biossegurança irrepreensíveis.

O controlo parcial da PCV2-SD foi atingido em algumas explorações através da implementação de alterações na dieta de suínos afectados, nomeadamente pela introdução de aditivos com propriedades antioxidantes, importantes na manutenção e melhoria do estado de saúde dos animais. Ainda assim, não se obtiveram resultados universalmente aceites que suportem o efeito benéfico destes compostos. Também a adição de vitamina E e/ou selénio poderá revelar-se vantajosa em explorações afectadas pela doença (Segalés, 2007). Num estudo experimental descreveu-se que o fornecimento de uma dieta suplementada com ácido linoleico conjugado contrabalançou os efeitos deletérios provocados pelo PCV2, potenciando a acção das células imunitárias efectoras e diminuindo a gravidade das lesões histopatológicas características de PCV2-SD (Bassaganya-Riera et al., 2003).

Antes do desenvolvimento de vacinas comerciais contra o PCV2, alguns clínicos utilizavam, com algum grau de sucesso, a “seroterapia”, cujo princípio se baseia na inoculação de um soro “hiperimune” obtido a partir do soro de suínos sobreviventes à doença (e que, por isso, se assumia possuírem elevados títulos de anticorpos anti-PCV2). No entanto, a maioria dos resultados obtidos com este procedimento revelou-se inconsistente e até deletéria, remetendo para prováveis riscos de biossegurança decorrentes da sua utilização (Segalés et al., 2006). Os mesmos receios aplicam-se ao uso de vacinas autógenas, preparadas a partir de homogeneizados de pulmão ou tecidos linfóides inactivados com formaldeído, obtidos de indivíduos doentes. Estes produtos foram esporadicamente utilizados por clínicos confrontados com elevadas taxas de mortalidade há alguns anos atrás, quando a disponibilidade de vacinas comerciais era bastante limitada (Opriessnig et al., 2007).

2.9.1. Vacinação

Dado o carácter multifactorial da PCV2-SD, sempre que surja uma suspeita de doença deve avaliar-se primeiramente a presença de potenciais factores de risco na exploração, averiguando-se quais deles contribuem mais para a situação; a aplicação de vacinas deve ser considerada apenas após a realização de uma apropriada análise de custo-benefício. Uma vez que não se encontram disponíveis no mercado fármacos antivirais de largo espectro, a vacinação, a par de adequadas medidas de higiene, adquire assim uma importância vital na prevenção e controlo das infecções virais. As vacinas veterinárias representaram apenas cerca de 23% do mercado global de produtos de saúde animal em 2007 (Meeusen, Walker, Peters, Pastoret & Jungersen, 2007). Mas o sector tem vindo a crescer consistentemente, principalmente devido a novos avanços tecnológicos no desenvolvimento de vacinas, ao aparecimento de resistências aos fármacos ou à emergência de novas doenças. Para além de melhorarem a saúde individual e a do efectivo, bem como os parâmetros produtivos, as vacinas desempenham um papel extremamente importante na Saúde Pública através da redução do uso de fármacos e hormonas e, conseqüentemente, dos seus resíduos na cadeia alimentar humana (Meeusen et al., 2007). Considerando o sector dos animais de produção, regista-se uma tendência crescente no volume de vendas de vacinas de utilização em suínos, esperando-se um crescimento progressivo do mesmo nos próximos anos. Os dados disponibilizados pela Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica - Apifarma (2010) na sua publicação periódica “A Indústria Farmacêutica em Números”, dão conta de uma interessante quota de mercado dos medicamentos imunológicos veterinários em 2009 (21%), a qual se situava apenas atrás da dos antimicrobianos (33,3%) e da dos antiparasitários (24,8%). De entre as vacinas antivirais para utilização em animais da espécie suína actualmente presentes no mercado, o maior volume de vendas deverá corresponder às vacinas contra o PCV2; seguindo a tendência do mercado internacional, que nos anos de 2010 e 2011 registou um fluxo na ordem dos 500 milhões e 550 milhões de dólares, respectivamente (M. Campbell, comunicação pessoal, Janeiro 2012), Portugal não será, seguramente, excepção (F. Fagundes, comunicação pessoal, Dezembro 2011).

2.9.1.1. Vacinas comerciais contra o PCV2 disponíveis no mercado

Existem várias vacinas comerciais disponíveis para prevenção das PCVD (Tabela 6).

Tabela 6. Vacinas comerciais contra PCV2

Vacina	Fabricante	Antigénio	Posologia e dose	Licença
Ingelvac CircoFLEX®	Boehringer Ingelheim	Proteína ORF2 de PCV2a expressa em baculovírus	1 ml IM* monodose	Leitões (≥2 semanas de idade)
Porcilis® PCV (Europa e Ásia)/ Circumvent® PCV (EUA e Canadá)	MSD Animal Health/Intervet- Merck Animal Health	Proteína ORF2 de PCV2a expressa em baculovírus	2 ml IM* <u>Porcilis® PCV:</u> Duas doses (3 a 5 dias de idade e 2 a 3 semanas depois)/Monodose (3 semanas de idade) <u>Circumvent® PCV:</u> Duas doses (3 e 6 semanas de idade)	Leitões <u>Porcilis® PCV:</u> ≥3 dias de idade <u>Circumvent® PCV:</u> ≥3 semanas de idade
Suvaxyn® PCV2 One Dose™ ¹ /Fostera™ (EUA e Canadá)	Fort Dodge Animal Health Inc./Pfizer Animal Health Inc.	Quimera inactivada PCV1- PCV2a	2 ml IM* monodose	Leitões (≥3 semanas de idade)
Circovac®	Merial	PCV2a inactivado	2 ml IM* <u>Vacinação básica:</u> - <u>Nulíparas:</u> duas doses (separadas entre 3 a 4 semanas) pelo menos 2 semanas antes da cobrição e uma dose pelo menos 2 semanas antes do parto - <u>Múltiparas:</u> duas doses (separadas entre 3 a 4 semanas) pelo menos 2 semanas antes do parto <u>Revacinação:</u> Uma dose a cada gestação pelo menos 2 a 4 semanas antes do parto <u>Leitões:</u> 0,5 ml IM* monodose	Reprodutoras; leitões (≥3 semanas de idade)

*IM - intramuscular

¹ Autorização de comercialização suspensa na Europa desde Fevereiro de 2010

Informação retirada de EMA (2010a), EMA (2011a), EMA (2011b), Pfizer Animal Health Inc. (2011) e Beach & Meng (2012).

Antes de 2005, o vírus detectado na maioria dos casos de PCV2-SD nos EUA e Canadá pertencia quase exclusivamente ao genótipo PCV2a, razão pela qual se desenvolveram vacinas baseadas neste genótipo (Beach, Ramamoorthy, Opriessnig, Wu & Meng, 2010). Apesar de existirem algumas preocupações quanto ao facto de os perfis antigénicos de PCV2a e PCV2b não serem idênticos (Dupont et al., 2008), as vacinas comerciais actualmente disponíveis conferem imunidade cruzada contra o genótipo PCV2b, reduzindo drasticamente a mortalidade em explorações nas quais este predomina (Fort et al., 2008).

A primeira vacina a ser comercializada foi a Circovac® (Merial). Trata-se de uma vacina inactivada que inclui na sua composição um adjuvante oleoso, tendo sido especialmente concebida para uso em reprodutoras e em leitões saudáveis com idade superior a 3 semanas. A vacinação dos leitões requer uma única administração intramuscular, enquanto marrãs e porcas são alvo de um protocolo vacinal distinto (Tabela 6). A imunidade mantém-se até 5 semanas após a transferência passiva dos anticorpos através da ingestão de colostro e inicia-se 2 semanas após a vacinação dos leitões, mantendo-se, pelo menos, durante 14 semanas (European Medicines Agency [EMA], 2011a). Circovac® foi inicialmente utilizada em França e na Alemanha sob licença temporária em 2004, encontrando-se disponível na maioria dos países europeus e no Canadá desde 2006/2007. Em 2007, previa-se que mais de meio milhão de reprodutoras estivessem vacinadas nestes países (Segalés et al., 2007).

A ocorrência de graves problemas derivados das epizootias de PCV2-SD registadas nos EUA levou a que os cientistas norte-americanos aprofundassem os seus conhecimentos relativamente à doença, o que culminou no desenvolvimento de produtos para uso exclusivo em leitões saudáveis de 3 a 4 semanas de idade. A Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim), a Circumvent® PCV (Intervet/Merck Animal Health) e a Porcilis® PCV (MSD Animal Health) são vacinas de subunidades baseadas na proteína da cápside do PCV2 expressa num sistema de baculovírus. Segundo o fabricante, após vacinação com Ingelvac CircoFLEX®, a protecção dos leitões inicia-se em 2 semanas mantendo-se, pelo menos, até 17 semanas (EMA, 2011b). O mesmo é válido para Porcilis® PCV, embora a imunidade dure até 22 semanas (EMA, 2010a). Recentemente foi introduzida no mercado norte-americano a vacina Fosterá™ PCV, que resulta da reformulação de um produto anteriormente denominado Suvaxyn® PCV2 One Dose™ (Fort Dodge Animal Health Inc.), actualmente suspenso na Europa. Esta vacina consiste num vírus quimérico inactivado contendo o imunogénico gene da cápside do PCV2 inserido no esqueleto genómico do PCV1 não patogénico. Segundo o fabricante, após administração do medicamento, inicia-se uma intensa resposta imunitária em 2 semanas, que se mantém durante 16 semanas (Pfizer Animal Health Inc., 2011).

A indução de uma resposta imunitária activa contra a proteína da cápside codificada por ORF2 consiste no principal mecanismo imunogénico de protecção conferido pela vacinação.

2.9.1.2. Eficácia vacinal

Apesar de não prevenir completamente a infecção por PCV2 e a disseminação viral, todas as vacinas actualmente registadas revelaram excelentes resultados em condições experimentais e em condições de campo, reduzindo significativamente as perdas associadas ao PCV2, tanto em suínos vacinados como em suínos provenientes de efectivos reprodutores vacinados.

Tomás et al. (2008) concluíram que, para uma maior probabilidade de reprodução experimental de PCV2-SD, os animais a utilizar em estudos experimentais deverão cumprir uma série de requisitos, os quais não encaixam nas condições naturais nas quais os suínos de recria ou de engorda normalmente desenvolvem doença clínica. Em estudos de campo, as hipóteses de reprodução de PCV2-SD são muito baixas, assumindo-se que a avaliação da eficácia vacinal em termos de protecção contra a doença clínica nem sempre pode ser realizada. Como alternativa, procede-se à avaliação de parâmetros relacionados com a infecção por PCV2, como a virémia, a disseminação do agente, a presença de lesões microscópicas características nos tecidos linfóides ou a carga viral nessas mesmas lesões, os quais permitem aferir indirectamente a eficácia da vacinação.

A redução da incidência de PCV2-SD, da mortalidade associada e dos custos associados à medicação necessária ao combate de doenças concorrentes, bem como a melhoria de parâmetros produtivos como o GMD e o IC são alguns dos benefícios observados em explorações que instauraram planos de vacinação contra o PCV2 (Kixmöller et al., 2008; Pejsek et al., 2010; Martelli et al., 2011; Fraile et al., 2012). Alguns destes benefícios foram analisados num estudo de meta-análise que investigou 66 ensaios realizados entre 2006 e 2008 em explorações infectadas naturalmente pelo PCV2 e que utilizaram as 5 vacinas naquela altura disponíveis no mercado mundial (Circovac®, Ingelvac® CircoFLEX, Suvaxyn® PCV2, Porcilis® PCV e Circumvent® PCV) (Kristensen, Baadsgaard & Toft, 2011). Verificou-se um efeito positivo da vacinação na produtividade e na taxa de mortalidade, sem diferenças estatisticamente significativas entre os produtos testados. O efeito foi extremamente significativo ao nível do GMD em todas as fases de produção (da recria à engorda), observando-se um aumento na ordem dos 42 gramas por dia na engorda. A taxa de mortalidade foi significativamente reduzida nos suínos de engorda (-4,4%), embora na recria não se tenham registado resultados apreciáveis (-0,25%). Os autores esclarecem que, devido ao facto de a maioria dos suínos ser vacinada ao desmame ou perto dele, são necessárias algumas semanas até que o efeito protector da vacinação contra o PCV2 se inicie, atingindo-se o máximo de protecção em fases da produção posteriores à recria. Apesar de considerarem o aumento obtido no GMD quase insignificante do ponto de vista económico, Kristensen et al. (2011) defendem que a vacinação contra o PCV2 é economicamente justificável na maioria das explorações suínas devido à redução considerável da taxa de mortalidade.

A eficácia das vacinas comerciais disponíveis é exaustivamente testada em estudos controlados. Devido à limitada doença clínica que se observa em leitões convencionais infectados apenas pelo PCV2, a maioria destes estudos utiliza modelos de co-infecção com outros agentes patogénicos suínos, o que apresenta como vantagem uma reprodução mais fiel das condições de campo, nas quais vários agentes de co-infecção contribuem para a plena exibição de PCV2-SD (Beach & Meng, 2012). Opriessnig et al. (2008d) avaliaram a

eficácia da vacinação contra o PCV2 na redução da sintomatologia clínica e das lesões observadas em suínos alvo de co-infecção por PRRSV e PCV2. A vacinação de 24 suínos com uma vacina quimérica, seguida do desafio com ambos os vírus 28 dias depois, induziu a produção de NA e a redução das lesões pulmonares, da disseminação fecal e da carga viral de PCV2 no soro e tecidos linfóides, comparativamente aos suínos não vacinados. Noutros trabalhos utilizando outros agentes de co-infecção habitualmente observados no campo, como SIV, PPV e Mh (Opriessnig, Patterson, Madson, Pal & Halbur, 2009c; Shen et al., 2010; Opriessnig et al., 2011) foram obtidos resultados semelhantes.

Existe alguma preocupação por parte de alguns médicos veterinários e produtores relativamente à eficácia da vacinação contra o PCV2 em leitões provenientes de efectivos PRRSV positivos. Sinha et al. (2010) comprovaram que, independentemente do estatuto PRRSV do indivíduo no momento da vacinação contra o PCV2, a sua eficácia permanece inalterada, registando-se uma resposta humoral eficaz acompanhada da redução dos níveis de virémia e da quantidade de antígeno viral nos tecidos linfóides (Sinha et al., 2010).

A grande maioria dos leitões infecta-se muito precocemente, podendo o ADN viral ser detectado com frequência em amostras de soro de suínos com cerca de 3 semanas de idade (Shen et al., 2010). Até muito recentemente, as investigações experimentais da eficácia vacinal estavam confinadas a leitões *naïves* (Opriessnig et al., 2008d; Opriessnig et al., 2009c) ou negativos (Fort et al., 2008; Fort et al., 2009b); Shen et al. (2010) demonstraram pela primeira vez que as vacinas comerciais são eficazes na redução ou manutenção de um nível mínimo da virémia e na redução da carga viral nos tecidos linfóides num modelo de co-infecção PCV2-PRRSV-PPV, vacinando leitões virémicos para PCV2 como forma de mimetizar mais fielmente as condições de campo.

2.9.1.3. Estratégias vacinais

Existem duas abordagens principais quanto ao controlo da infecção por PCV2. A primeira consiste na vacinação das reprodutoras, permitindo que os MDA protejam os leitões, tornando-lhes possível construir a sua própria imunidade a partir da exposição natural ao vírus. A alternativa é a vacinação directa e precoce dos leitões antes da ocorrência de replicação viral massiva, estimulando-se uma resposta imunitária mais completa. A principal vantagem de vacinar as reprodutoras em detrimento dos leitões consiste numa poupança apreciável de mão de obra e dinheiro; contudo, há que ter em consideração que o sucesso deste esquema vacinal reside na promoção de níveis elevados de imunoglobulinas no colostro, ao qual os leitões devem ter acesso em quantidade e qualidade suficientes durante os primeiros dias de vida. Outro argumento que poderá contribuir para tornar a vacinação das reprodutoras mais atractiva, será o de minimizar a imunoestimulação durante as primeiras semanas de vida do leitão, a qual poderá constituir um factor de risco para o desenvolvimento de PCV2-SD (Krakowka et al., 2001). De igual modo, a eficácia da

vacinação dos leitões depende da *compliance* para com os procedimentos que asseguram que cada indivíduo seja correctamente vacinado, o que pode ser desafiante em alguns sistemas produtivos. Este protocolo vacinal é, sobretudo, aconselhado em explorações que recebam leitões de várias proveniências ou nas quais exista um histórico de má ingestão e/ou má qualidade de colostro.

No Japão e na UE, em 2010, a aprovação do uso de uma vacina de reprodutoras (Circovac®) em leitões com idade superior a três semanas, tornou possível a imunização activa das reprodutoras e passiva dos leitões, seguida depois da imunização activa destes últimos. O objectivo deste esquema vacinal consiste em assegurar protecção máxima a todo o efectivo, sendo particularmente útil em explorações de grande dimensão, com grande densidade animal e com problemas de manejo.

Qualquer que seja a estratégia escolhida, o seu objectivo primordial é conferir a protecção muito precoce do sistema imunitário do leitão, impedindo que a exposição massiva ao PCV2 lhe provoque uma alteração funcional importante e irreversível. Mais tarde, e sujeitos a uma inevitável exposição reiterada ao PCV2, os suínos possuirão um sistema imunitário maduro e íntegro, montando uma resposta imunitária activa protectora de longa duração.

A utilização de vacinas monodose ou em duas doses é também um ponto de discussão que depende, obviamente, da eficácia do produto e da magnitude do desafio a que o animal é sujeito (Burch, 2008). Regra geral, os produtos que exigem a inoculação de apenas uma dose são mais populares devido à diminuição do custo de mão de obra, à conveniência e à *compliance*; a principal desvantagem da não aplicação de um *booster* reside na geração de um menor número de células de memória, o que se traduz num período de tempo mais alargado sem contacto com o antigénio viral. Opriessnig et al. (2009c) estudaram a eficácia da aplicação de uma ou duas doses de uma vacina comercial, sujeitando os suínos a um desafio 3 meses após a vacinação. Como esperado, os suínos vacinados com duas doses do mesmo produto comercial exibiram níveis de anticorpos anti-PCV2 mais elevados uma semana após a revacinação. Para além desta, nenhuma outra diferença, em termos de imunidade humoral, foi observada entre os dois protocolos vacinais. Tanto a utilização da vacina em monodose como em duas doses revelou-se eficaz na redução da virémia e das lesões microscópicas associadas ao PCV2, comparativamente a controlos positivos não vacinados. A aplicação de duas doses pode, contudo, revelar-se ligeiramente mais vantajosa quando a pressão do vírus de campo é muito precoce e elevada, quando os níveis de MDA são muito elevados e é necessária uma vacinação precoce (Martelli et al., 2011) ou quando a protecção não é suficiente para cobrir todo o período de engorda. Em situações de *compliance* baixa ou duvidosa, a implementação de um programa vacinal de duas doses também pode ajudar a garantir que mais indivíduos fiquem expostos à mesma quantidade de antigénio vacinal (Potter, 2010). Ainda assim, assiste-se a uma tendência cada vez mais crescente da aplicação de apenas uma dose vacinal, pelo que os fabricantes se têm

empenhado na concepção de vacinas cada vez mais imunogénicas, permitindo um rápido estabelecimento da imunidade com interferência mínima com a imunidade materna, mantendo-se os níveis de protecção durante toda a vida produtiva dos animais.

2.9.1.3.1. Efeito da vacinação contra o PCV2 na transmissão vertical

A transmissão vertical do PCV2 pode ser um problema nos efectivos reprodutores, dificultando a gestão da saúde colectiva. Madson et al. (2009a) consideraram que a capacidade de transmissão do vírus parece estar ligada à carga viral do sémen, pelo que a utilização de vacinas para diminuição da carga viral sistémica e para prevenção da disseminação do agente poderá ser uma boa estratégia para a limitação da circulação viral nos efectivos reprodutores. Opriessnig et al. (2011) alertam para a pouca atenção dispensada aos animais adultos aquando do planeamento vacinal pelo facto de estes não desenvolverem PCVD frequentemente. Estes autores comprovam que a administração de uma dose de uma vacina quimérica comercial resulta numa seroconversão eficaz, acompanhada de uma diminuição significativa da virémia e da disseminação do vírus no sémen, comparativamente aos animais não vacinados. Não obstante a transmissão seminal, alguns autores consideram que são sobretudo as porcas gestantes infectadas pelo PCV2 e virémicas que transmitem o vírus aos fetos por infecção intrauterina (Ha et al., 2008), pelo que a limitação da carga viral previamente à gestação é extremamente importante. Um estudo sobre o potencial efeito protector da vacinação das reprodutoras na prevenção da replicação viral e infecção fetal *in utero* confirmou o papel da virémia da porca na transmissão transplacentária da infecção (Madson et al., 2009c). Os autores trabalharam com porcas gestantes *naïves* para o PCV2, administrando-lhes uma vacina de subunidades ou um placebo aos 28 dias de gestação, e aos 56 dias de gestação foram inoculadas por via oronasal com um isolado de PCV2b. Apesar de não ter provocado problemas reprodutivos, a infecção experimental traduziu-se em infecção fetal, não evitada pela vacinação, detectando-se virémia fetal e ADN viral no colostro (outra via de transmissão importante). Contudo, a vacinação revelou-se eficaz na prevenção de lesões microscópicas associadas ao antigénio viral nos leitões, pelo que a vacina poderá desempenhar um papel importante na redução da replicação viral fetal. Assim, apesar de a vacinação não prevenir completamente a infecção intrauterina, é eficaz na redução da virémia e da carga viral sistémica das porcas, reduzindo a exposição dos leitões a elevados níveis virais e diminuindo a pressão de infecção, tanto *in utero* como no pré-desmame, contribuindo para a melhoria dos parâmetros produtivos (Beach & Meng, 2012).

2.9.1.3.2. Vacinação das reprodutoras

Uma das estratégias para a prevenção da ocorrência de PCV2-SD nos leitões consiste em vacinar as reprodutoras, reduzindo a virémia e assegurando um aumento de anticorpos anti-

PCV2 neutralizantes no colostro. Porcas infectadas naturalmente e porcas vacinadas com o produto comercial disponível para reprodutoras, também exibiram desenvolvimento de um componente de imunidade celular, na medida em que o seu colostro, sobretudo o do grupo vacinado, continha IFN- γ -SC (Goubier et al., 2008). Embora a transferência de IFN- γ -SC à descendência das porcas vacinadas tenha sido provada, o seu efeito protector não pode ser totalmente esclarecido, uma vez que só se detectaram nos leitões por um breve período de tempo. Mais recentemente, um grupo de investigadores coreanos (Oh, Seo, Han, Park & Chae, 2012) comprovou a existência de um número significativamente mais elevado de IFN- γ -SC em leitões de mães vacinadas após ingestão de colostro, atribuindo-lhes um papel crítico na protecção contra um desafio pelo PCV2 às 3 semanas de idade. Assim sendo, existem evidências de que a transferência de células imunitárias maternas constitui outro mecanismo de defesa contra a infecção nos leitões recém-nascidos e que a eficácia da toma do colostro não depende exclusivamente dos anticorpos que contém, mas também de células imunocompetentes. A comprová-lo, vários estudos sugerem que nem sempre os anticorpos passivamente adquiridos protegem os leitões na totalidade, na medida em que o grau de protecção conferida contra a infecção viral é título-dependente (McKeown et al., 2005). Contudo, no geral, os títulos de anticorpos parecem ser bons marcadores do nível de protecção, verificando-se uma correlação entre os títulos de anticorpos da mãe e da descendência. Os leitões com um elevado grau de imunidade passiva estão mais protegidos após serem sujeitos a um desafio com o PCV2. Ao exibirem um título de anticorpos elevado, estável e homogéneo, estes indivíduos não exibem uma serconversão abrupta, ao contrário de leitões provenientes de mães não vacinadas, com reduzidos títulos de anticorpos. Também os leitões nascidos de mães não vacinadas exibem uma maior carga viral nos linfonodos, sinais clínicos mais intensos e lesões mais graves (Charreyre et al., 2006a).

A resistência no ambiente e o carácter ubiquitário do PCV2 facilitam o seu contacto com os leitões desde as suas primeiras horas de vida. Este contacto é deveras preocupante, uma vez que, quanto mais precocemente ocorrer infecção, maiores as probabilidades de se registar doença clínica (López-Soria et al., 2005). Sabe-se que leitões nascidos de mães vacinadas disseminam uma menor quantidade de vírus no ambiente. Charreyre et al. (2006b) analisaram por PCR amostras de fezes de leitões provenientes de mães vacinadas e não vacinadas pertencentes a explorações afectadas por PCV2-SD. Às 2 semanas de idade, quando mais de 35% dos leitões nascidos de mães não vacinadas disseminava o vírus nas fezes, apenas 5% dos leitões nascidos de mães vacinadas o faziam. O mesmo estudo apurou que, após início da vacinação, a mortalidade devida a PCV2-SD não só decresceu significativamente nos leitões nascidos de mães vacinadas, como também nos grupos controlo não vacinados. O decréscimo de casos de doença clínica observado nos animais não vacinados foi atribuído à diminuição global da disseminação de PCV2, o que se traduziu numa menor carga viral ambiental.

Em condições de campo, a vacinação de porcas gestantes também demonstrou melhorar significativamente os parâmetros produtivos da sua descendência. De modo a avaliar o efeito da vacinação das reprodutoras na descendência, o peso médio ao desmame de 1007 leitões testemunhas foi comparado com o peso médio ao desmame de 955 leitões nascidos de porcas vacinadas. Verificou-se um aumento significativo do mesmo na ordem dos 0,93 kg após o início da vacinação ($P < 0,001$) (Brons, Neto, Vila, Longo & Joisel, 2010). De igual modo, registou-se uma menor percentagem de leitões “pequenos” (com menos de 6 kg de peso vivo) ao desmame, geralmente associados a elevada mortalidade e ritmos de crescimento mais lentos. Também a administração de uma vacina comercial num pequeno efectivo de 90 porcas subclínicamente afectado pelo PCV2 se traduziu numa vantagem significativa ao nível do GMD para a descendência das fêmeas vacinadas, registando-se uma diminuição de 9 dias no seu período de permanência na engorda (Sidler, Kurmann, Buergi, Brugnera & Sydler, 2010). Consequentemente, os custos anuais com a alimentação diminuíram significativamente no grupo vacinado (-4,10€/suíno) comparativamente com o grupo não vacinado. Após início da vacinação, registou-se uma diminuição abrupta da mortalidade no sector de engorda o que, associado aos menores custos de alimentação, se traduziu em benefícios económicos extremamente vantajosos, obtendo-se um retorno de investimento muito positivo. A mesma equipa obteve resultados similares noutro estudo semelhante, observando que leitões provenientes de mães vacinadas possuem títulos de anticorpos mais elevados, o que se traduz num melhor estado geral de saúde, justificado pelo maior GMD registado (Kurmann et al., 2011). Mesmo na ausência de doença clínica, pequenas quantidades de PCV2 podem condicionar a maturação e o crescimento dos indivíduos por interferência com células em rápida divisão. Kurmann et al. (2011) consideraram que os benefícios económicos obtidos no grupo vacinado são fruto da menor pressão viral a que os indivíduos foram sujeitos como consequência da vacinação das suas mães e da transferência de imunidade colostrar.

A vacinação das reprodutoras reflectiu-se também num efeito benéfico a nível do seu desempenho reprodutivo, registando-se uma melhoria dos parâmetros reprodutivos nos efectivos reprodutores vacinados. Estes resultados observaram-se especialmente em explorações nas quais não existia um histórico de problemas reprodutivos associados ao PCV2, pelo que vários estudos de campo foram realizados no sentido de caracterizar este efeito inesperado. Um ensaio de campo em larga escala, realizado em 277 explorações alemãs, revelou uma melhoria estatisticamente significativa na maioria dos parâmetros reprodutivos 4 meses após o início da vacinação (Joisel, Brune, Schade, Longo & Charreyre, 2008) (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação das *performances* reprodutivas em 277 explorações antes e após o uso de uma vacina comercial (Adaptado de Joisel et al., 2008)

	Antes da vacinação ¹	Após vacinação ¹	Diferença (p)
% de partos	81,1	83,2	+2,04 (0,022)
% de retorno em cio	14,4	11,5	-2,91 (<0,001)
% de abortos	1,95	1,38	-0,57 (0,004)
Nascidos totais/ninhada	11,8	12,3	+0,46 (0,011)
Nascidos vivos/ninhada	10,9	11,4	+0,50 (0,002)
Nascidos mortos/ninhada	1,39	1,29	-0,10 (0,630)*
Desmamados/ninhada	9,4	9,9	+0,47 (<0,001)
Desmamados/porca/ano	21,2	22,4	+1,13 (<0,001)

¹ média; * $p>0,05$

Os dados obtidos confirmam que o PCV2 pode prejudicar as *performances* reprodutivas de um modo subclínico, provavelmente independente da ocorrência de PCV2-SD nos leitões.

2.9.1.3.3. Vacinação dos leitões

Na fase epizootica da PCV2-SD registava-se uma mortalidade muitíssimo elevada ao desmame e/ou no início da recria; posteriormente, na fase enzoótica, a mortalidade desceu significativamente, passando a doença a ocorrer mais tardiamente, à medida que os efectivos reprodutores construíam a sua imunidade. A mortalidade decaiu na recria, mas permaneceu elevada na engorda, facto justificado com o desenvolvimento da imunidade materna e o controlo básico da infecção aguda em idades mais precoces, atrasando a infecção e a virémia para fases mais tardias do ciclo produtivo (Burch, 2008). Embora certos trabalhos não confirmem esta teoria (Segalés & Cortey, 2010), alguns clínicos concordam que terá ocorrido uma alteração na idade de manifestação da PCV2-SD (Martelli et al., 2011; R. Mesquita, comunicação pessoal, Janeiro 2012). Nestes casos, os resultados obtidos com a vacinação das reprodutoras poderão não ser os desejados, revelando-se a vacinação dos leitões a estratégia mais adequada.

A vacinação dos leitões levanta algumas dúvidas nos casos em que a sintomatologia é muito precoce ou muito tardia, sobretudo no que respeita à existência de anticorpos derivados da infecção recente pelo vírus de campo ou anticorpos de origem materna que possam condicionar a eficácia vacinal.

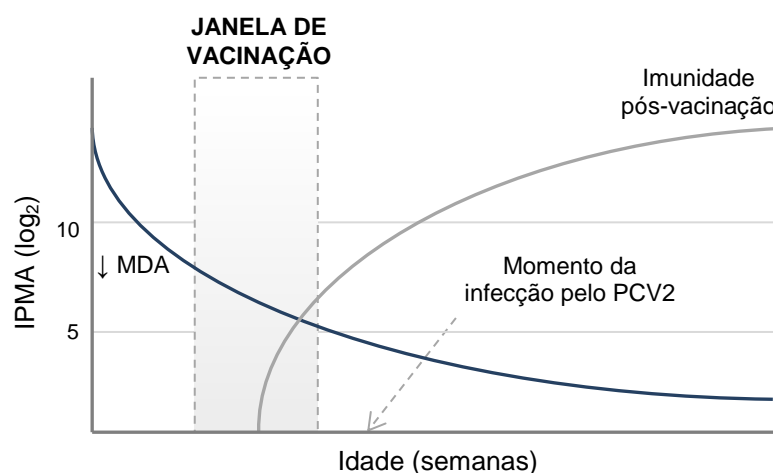
O efeito dos MDA na imunidade induzida pela vacinação está amplamente estudado. Assim, tem sido demonstrada a existência de uma relação de proporcionalidade inversa entre os títulos de MDA no momento da vacinação e os níveis de TA e NA subsequentemente induzidos, sugerindo uma influência dos mesmos na duração da imunidade conferida pela vacinação (Fort et al., 2008; EMA, 2010b; Fraile et al., 2012). Fort et al. (2008) verificaram que, após a inoculação de duas doses de uma vacina de subunidades às 4 e às 6 semanas de idade, a imunidade de origem materna interferiu ligeiramente com o desenvolvimento de

anticorpos anti-PCV2 (totais e neutralizantes). Todavia, a segunda dose vacinal mostrou-se suficientemente forte para ultrapassar a imunidade materna, exibindo os suínos vacinados uma resposta humoral muito mais elevada que os suínos controlo não vacinados. Posteriormente, o mesmo grupo de trabalho avaliou o efeito dos MDA na vacinação de leitões de 3 semanas de idade apenas com uma dose do mesmo produto comercial, tendo observado que os indivíduos com títulos de MDA mais elevados no momento da vacinação não seroconverteram como resposta à mesma. Ainda assim, a eficácia global da vacinação não foi ameaçada, verificando-se uma redução da virémia, da disseminação do PCV2 e da carga viral tecidual nos grupos vacinados, comparativamente com os grupos controlo não vacinados (Fort et al., 2009b). Resultados semelhantes foram obtidos por Martelli et al. (2011) ao utilizar a monodose da mesma vacina, reforçando a observação que a eficácia da vacinação não foi totalmente perturbada pelos títulos de MDA elevados, sendo uma dose da vacina em estudo suficiente para a imunização de leitões seropositivos, conferindo-lhes protecção clínica e virológica, mesmo em casos de infecção tardia relativamente ao momento da vacinação (≥ 4 -5 meses).

A estratégia vacinal baseada na vacinação do leitão deve induzir uma seroconversão precoce e uma interferência mínima com os MDA, de modo a proteger o animal durante toda a vida produtiva. Deste modo, idealmente, a vacina contra o PCV2 deve ser administrada quando os anticorpos de origem materna são mínimos e antes de os leitões se infectarem naturalmente (Figura 8). Uma vez que os níveis de MDA e a dinâmica de infecção pelo PCV2 variam entre explorações, o momento óptimo de vacinação depende da exploração em questão, pelo que a melhor estratégia será a que se adapta à situação epidemiológica do efectivo em análise. A identificação do momento óptimo de vacinação é de particular interesse, especialmente quando ocorrem falhas vacinais devido a programas vacinais desajustados. Aparentemente, uma vacinação muito precoce é desnecessária, dado o carácter protector da imunidade materna, podendo mesmo ser contraproducente devido à potencial interferência dos MDA com a vacina. Por outro lado, uma vacinação demasiado tardia pode constituir um risco de falha vacinal pois, assim que os níveis de imunidade materna diminuem, os leitões podem ser imediatamente infectados pelo PCV2. Considerando que o desenvolvimento de uma resposta imunitária humoral após vacinação só é assegurado caso os valores de TA no momento da vacinação (ou seja, MDA) estejam abaixo de $10 \log_2$ (valores de IPMA), e que indivíduos com títulos de TA iguais ou inferiores a $5,5 \log_2$ são potencialmente mais susceptíveis à infecção por PCV2, Fort (2009) e Fraile et al. (2012) propuseram uma “janela de vacinação” (Figura 8), definida como o intervalo no qual os leitões devem ser vacinados de modo a minimizar a interferência com os MDA e, simultaneamente, evitar uma lacuna na imunidade. Fort (2009) defende que o estudo dos perfis serológico e virológico do efectivo são ferramentas extremamente úteis na definição da idade que coincide com esta “janela de vacinação”, permitindo a implementação da

vacinação de acordo com a mesma. Todavia, a decisão do momento ideal de vacinação nem sempre é tão linear, visto existir um espectro de diversos níveis de protecção conferida pelos MDA que se reflecte numa enorme variação do título de anticorpos anti-PCV2 nos leitões de cada ninhada (EMA, 2010b). Ainda assim, não é de desvalorizar que, apesar destas diferenças, a vacinação resulta na promoção de títulos de anticorpos uniformes.

Figura 8. Perfil de anticorpos de origem materna e induzidos pela vacinação e janela de vacinação para o PCV2 (Fonte: Fort, 2009)



A vacinação demonstrou melhorar significativamente os parâmetros produtivos de suínos naturalmente expostos ao PCV2. Pejsak et al. (2010) mostraram que, numa exploração afectada por PCV2-SD, os resultados produtivos obtidos com a vacinação dos leitões com Circovac® foram tão bons ou até melhores que os registados antes da ocorrência do surto de doença. Após instituição do regime de vacinação, comparativamente ao período coincidente com o surto de PCV2-SD, foram observadas melhorias globais, estatisticamente significativas, nas médias da taxa de mortalidade (-13%), do peso ao abate (+6 kg de peso vivo), do IC (-0,3) e do GMD (+72 g/dia). Simultaneamente, registou-se uma redução de 10 dias de permanência na engorda e de 1/3 no consumo de antibióticos. As melhorias obtidas ao nível do GMD ultrapassaram os valores observados antes da ocorrência de PCV2-SD, facto que os autores atribuíram ao controlo de possíveis infecções subclínicas por PCV2 subestimadas. Ao optarem por estudar também os efeitos de um protocolo de vacinação apenas em reprodutoras e um protocolo combinado reprodutoras+leitões, os mesmos autores obtiveram resultados produtivos semelhantes aos obtidos para a vacinação de leitões; contudo, observaram valores de GMD ligeiramente superiores no grupo em que simultaneamente reprodutoras e leitões foram vacinados. Esta ocorrência pode ser justificada pelo facto de que, quando apenas as mães são vacinadas, alguns leitões podem não receber uma quantidade suficiente de colostro e que, quando apenas os leitões são vacinados, num surto agudo e com uma elevada pressão viral, muitos deles podem encontrar-se já imunocomprometidos, a um nível que impede a correcta imunização activa,

mas, quando ambos são vacinados, espera-se um desempenho mais otimizado. A vacinação de leitões com 3 semanas de idade com Circovac® também se reflectiu numa redução da virémia e da excreção fecal de PCV2 após um desafio às 5 semanas de idade, comparativamente a controlos não vacinados (Chevalier, Fischer & Joisel, 2010).

Kixmöller et al. (2008) estudaram a eficácia de Ingelvac® CircoFLEX™ na imunização activa de leitões com 3 semanas de idade. O estudo foi realizado num efectivo afectado por PCV2-SD, e no qual a infecção por PCV2 era agravada pela co-infecção com PRRSV e *Mycoplasma hyorhinis*. O início da virémia e da sintomatologia eram observados cerca das 9-10 semanas de idade. Comparativamente aos indivíduos tratados com um placebo, os indivíduos vacinados apresentaram uma carga virémica mais baixa e uma menor duração da virémia ($P<0,0001$). A diminuição do número de animais positivos e da carga viral foi suficiente para que os animais vacinados exibissem uma redução de 53% na taxa de mortalidade ($P=0,001$), um aumento do GMD, que se traduziu num peso final de +4,7 kg, e uma redução significativa de sintomatologia clínica ($P\leq 0,0004$). Foi também demonstrado que a vacinação contra o PCV2 pode influenciar a prevalência de co-patogénos, sendo o número destes organismos muito mais elevado em amostras de pulmões de animais tratados com o placebo.

Segalés et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes em termos clínicos, patológicos e virológicos após o uso de Suvaxyn® PCV2 One Dose™ em três explorações afectadas por PCV2-SD. O produto comercial foi capaz de reduzir de forma consistente, nas três unidades de produção, os sinais clínicos de doença, bem como a carga viral nos órgãos linfóides e no sangue e a mortalidade global na recria e na engorda. Ao procederem à avaliação das lesões associadas ao PCV2 num elevado número de animais vacinados e não vacinados, os autores concluíram que a gravidade lesional nos primeiros foi significativamente menor ($P<0,01$) em todas as explorações e em todos os tecidos (linfonodo inguinal superficial, linfonodo mesentérico e amígdala) analisados. Considerando que os casos de PCV2-SD diferem dos de suínos saudáveis infectados subcl clinicamente quanto à quantidade de PCV2 presente nos tecidos linfóides e na gravidade das lesões microscópicas, os resultados obtidos indicam que a vacinação contra o PCV2 pode diminuir o impacto destes factores também em indivíduos subcl clinicamente infectados.

Similarmente, Martelli et al. (2011) demonstraram o efeito benéfico da vacinação de leitões com 3 semanas de idade com uma monodose de Porcilis® PCV em condições de campo, nomeadamente em duas explorações nas quais a PCV2-SD se registava sobretudo na fase de engorda. A vacinação reduziu a taxa de mortalidade global, facto que se deveu a uma diminuição do número de suínos afectados pela doença (apenas 1 suíno de 408 vacinados sucumbiu à doença). Estes resultados permitiram concluir que a probabilidade de um leitão vacinado morrer de PCV2-SD é 12 vezes menor que a de um leitão controlo não vacinado. Também a morbilidade, contabilizada neste estudo como o número de administrações

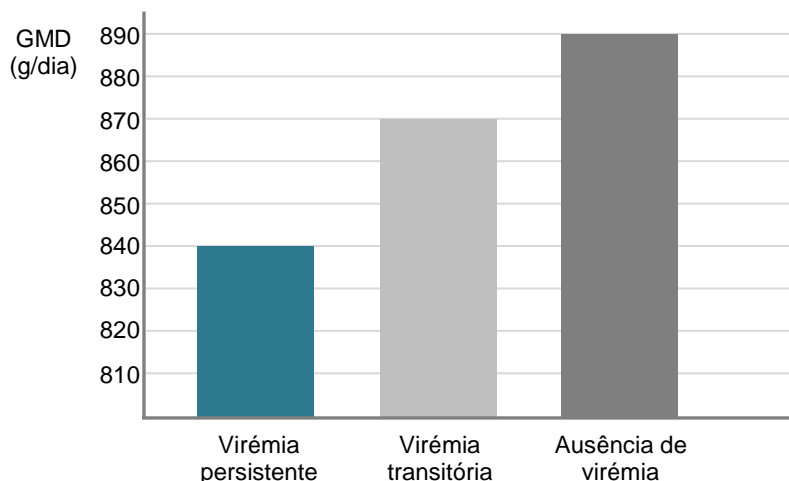
individuais de antibióticos, foi influenciada pela vacinação tendo-se verificado que, em média, os animais não vacinados receberam mais 30% de injeções comparativamente aos vacinados. Durante o período de infecção, os suínos não vacinados evidenciaram cargas virais mais elevadas no soro, enquanto que nos suínos vacinados a duração da virémia e a carga viral, bem como a sintomatologia clínica associada, foram significativamente menores. Consequentemente, obtiveram-se melhores resultados produtivos nos animais vacinados, reflectidos num melhor GMD durante o período de virémia (+70 g/dia) e num maior peso ao abate (+4,5 kg). A utilização do mesmo produto em duas doses (Fort et al., 2008) ou em monodose (Fort et al., 2009b) em estudos experimentais permitiu reduzir a excreção nasal e fecal em cerca de 14 vezes e preveniu ou encurtou a virémia. Face a estes resultados, alguns autores sugerem que a vacinação pode não só ser benéfica na redução da carga viral nas excreções e da doença numa base individual, como também numa escala populacional (Fort et al., 2008; Fraile et al., 2012). Laza et al. (2011) avaliaram o efeito da vacinação com Porcilis® PCV numa exploração afectada subclínicamente pelo PCV2, salientando os seus benefícios económicos. Os dados produtivos referentes a 31680 leitões vacinados foram comparados com os de 36858 leitões não vacinados. Os animais vacinados apresentaram melhor GMD e IC, tendo a mortalidade e a morbilidade diminuído 45 e 63%, respectivamente, comparativamente ao grupo não vacinado. Outro facto importante consistiu na redução dos custos com a medicação durante o período de engorda (-1,08€/animal). Ainda que não se tenham registado diferenças entre os dois grupos no que se refere ao peso ao abate, os animais vacinados exibiram maior homogeneidade, para além de um menor tempo de permanência na engorda (-9,4 dias). Ao ponderar estes factores, considerou-se que os benefícios obtidos geraram um retorno do investimento de aproximadamente 5,6€ por suíno, incluindo o custo da vacina. Da mesma forma, a utilização do produto análogo comercializado nos EUA e no Canadá, Circumvent® PCV, numa exploração onde o vírus circulava subclínicamente, permitiu uma uniformização dos lotes à idade de abate, o que se revelou extremamente vantajoso em termos económicos ao permitir a introdução dos suínos no mercado com uma idade mais baixa e com um peso mais uniforme e constante (Venegas-Vargas et al., 2011).

2.9.1.4. A importância da vacinação na redução da virémia

A redução da virémia desempenha um papel fundamental no bem-estar e no desempenho produtivo dos suínos, pois permite controlar a replicação, a disseminação e a excreção virais. Os danos causados pelo PCV2 dependem sobretudo da quantidade de vírus presente nos animais, variando desde o aumento da mortalidade a efeitos menos óbvios, como já referido (redução do GMD e do peso ao abate e o aumento do IC e dos dias de permanência na engorda). Dada a existência de uma relação de proporcionalidade directa inequívoca entre a carga viral e a severidade da expressão da doença em suínos infectados

pelo PCV2 (Olvera et al., 2004; Krakowka et al., 2005), o controlo dos níveis virais é essencial à obtenção de resultados produtivos óptimos. A duração da virémia também parece ser importante, na medida em que, quanto mais prolongada, mais pronunciado o seu efeito negativo nos parâmetros produtivos, especialmente no GMD. Na figura 9 pode observar-se o efeito do controlo da virémia neste parâmetro produtivo.

Figura 9. Relação entre a virémia por PCV2 e o GMD (Fonte: Dewey et al., 2010)



Estes resultados foram obtidos num ensaio de campo no qual se pretendeu descrever a prevalência e o impacte produtivo da virémia através da comparação da eficácia de duas vacinas comerciais e de um placebo, significando que pode ocorrer virémia quando os animais vacinados são expostos ao vírus de campo, e que as diversas vacinas comerciais diferem na sua capacidade de controlo da virémia (Eggen, 2010). Estas diferenças podem estar relacionadas com factores tão variados como a natureza e a concentração do antigénio, o tipo de adjuvante e/ou a dose de administração. Este facto é aceite pelos próprios fabricantes, que se tentam demarcar da concorrência através da produção de vacinas cada vez mais eficazes na estimulação de uma resposta imunitária pós-vacinação forte e duradoura. A influência da carga viral de PCV2 na ocorrência de efeitos produtivos negativos em suínos vacinados também foi analisada por Lyoo, Joo, Caldwell e Davies (2010). Os autores analisaram a problemática das subpopulações de suínos leves na fase final da engorda apesar da existência de um protocolo de vacinação rotineiro contra o PCV2. Esta ocorrência estava provavelmente relacionada com uma ineficaz protecção conferida pela vacinação, levando ao desenvolvimento de um nível de virémia incompatível com uma produção otimizada. Os resultados revelaram maiores cargas virais e mais indivíduos virémicos no grupo dos suínos mais leves ao abate, comparativamente com o grupo dos suínos mais pesados. Além disso, as percentagens de suínos virémicos para PCV2b foram muito mais elevadas no grupo dos suínos leves, levantando a hipótese da necessidade de uma vacina baseada no genótipo em causa.

Ao induzir a activação do sistema imunitário, a virémia consegue afectar as vias homeostáticas que regulam o metabolismo, a distribuição dos nutrientes, o comportamento, a termorregulação e a actividade do eixo hipotálamo-hipofisário. Como uma das mais importantes consequências desta imunoactivação salienta-se o redireccionamento dos nutrientes do crescimento para a defesa do organismo o que, juntamente com o decréscimo da ingestão, resulta num emagrecimento progressivo (Colditz, 2002). Além disso, sendo um vírus que replica preferencialmente em células com elevados índices mitóticos, o PCV2 pode atrasar ou afectar irreversivelmente a maturação de vários sistemas orgânicos, favorecendo atrasos no crescimento. O ganho de peso, sobretudo em animais jovens, encontra-se dependente do efeito do vírus nas suas células e, mesmo na ausência de PCVD explícitas, pequenas quantidades de antígeno viral podem interferir com a maturação dos indivíduos (Kurmann et al., 2011).

2.9.1.5. Imunidade após vacinação

Só muito recentemente os mecanismos pelos quais as vacinas conseguem estimular uma imunidade protectora começaram a ser objecto de estudo mais intenso. Para uma eficácia vacinal óptima, os NA devem ser induzidos e permanecer acima de certo limiar durante toda a fase produtiva do animal, uma vez que valores abaixo deste nível protector resultarão num desempenho suboptimizado após infecção pelo PCV2 (Eggen, 2010).

Fort et al. (2009b) demonstraram que os anticorpos presentes no colostro desempenham um papel importante face a um desafio com o PCV2, ao notarem que nem todos os leitões não vacinados provenientes de um efectivo reprodutor seropositivo para PCV2 desenvolveram virémia. Posteriormente, os investigadores descobriram que estes indivíduos possuíam títulos de TA e NA significativamente mais altos ($P < 0,01$) que os animais virémicos do mesmo grupo. Tendo estes valores sido obtidos antes do desafio experimental com o vírus, pode inferir-se o papel protector dos MDA nestes animais. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que títulos de TA abaixo de $5,5 \log_2$ e de NA abaixo de $3,9 \log_2$ (valores de IPMA) podem ser propostos como potenciais limiares para a susceptibilidade à infecção. Fort et al. (2008) concluíram que a vacinação origina títulos de anticorpos muito acima do limiar de protecção proposto visto que, após a aplicação de duas doses de uma vacina comercial de subunidades, se observou uma completa prevenção da virémia, presumivelmente como resultado de um título médio de TA de $11,8 \pm 1,9 \log_2$, e de NA de $7,5 \pm 1,7 \log_2$.

Muito recentemente, Tribble et al. (2012) equacionaram a hipótese de a resposta imunitária humoral poder diferir quantitativa e qualitativamente entre vacinação e infecção. Os autores concluíram que a quantidade de NA gerada após vacinação é aproximadamente o quádruplo da originada como resposta à infecção por PCV2, o que foi atribuído a uma

diferente reactividade a diversos polipéptidos da cápside proteica viral. Pelo contrário, os níveis de TA não diferiram significativamente entre suínos infectados e suínos vacinados. Apesar de se admitir que a base da eficácia vacinal reside no efeito protector de anticorpos anti-PCV2 adquiridos passiva ou activamente, existem provas de que uma resposta humoral débil ou ausente após vacinação nem sempre é sinónimo de falta de protecção (Kekarainen et al., 2010). Fenaux, Opriessnig, Halbur, Elvinger e Meng (2004b) mostraram que nem todos os suínos seroconverteram após imunização com um vírus quimérico PCV1-2 mas que, face a um desafio com a estirpe selvagem do PCV2, evidenciaram estar protegidos ao não desenvolverem virémia e sintomatologia clínica e exibindo menores cargas virais e lesões linfóides menos severas. Os autores argumentam que respostas humorais elevadas não são absolutamente necessárias à protecção dos animais, pelo que é possível que tenha sido produzida uma resposta imunitária de natureza celular, igualmente importante na indução da protecção contra o PCV2. Fort et al. (2009b) chegaram a conclusões semelhantes, ao descreverem pela primeira vez o desenvolvimento de imunidade mediada por células após inoculação experimental de uma dose de uma vacina comercial de subunidades baseada na proteína da cápside do PCV2 expressa num sistema de baculovírus. Já Martelli et al. (2011), ao investigarem a eficácia e a imunogenicidade da mesma vacina face a um desafio de campo, demonstraram que, para além de uma resposta humoral, uma dose do produto testado induziu uma resposta imunitária específica mediada por células. Duas semanas após a vacinação verificou-se um aumento da frequência de IFN- γ -SC, contudo, nos animais não vacinados, o nível de IFN- γ -SC permaneceu a níveis basais durante o período pós-vacinal. Após ocorrência da infecção pelo vírus de campo o número de IFN- γ -SC nos animais vacinados evidenciou um percurso errático com aumentos individuais moderados; já os animais controlo não vacinados exibiram um aumento significativo ($P < 0,01$) dos valores médios de IFN- γ -SC, os quais se mantiveram elevados até ao final do ensaio de campo e foram associados a uma redução da virémia. Os resultados obtidos coincidem com dados anteriormente apresentados por Fort et al. (2009a), que referiram que nos suínos com carga viral baixa ou ausente, como ocorre usualmente nos animais vacinados, o número destas células é mantido baixo ou a um nível residual, como consequência da activação primária após vacinação. Por sua vez, os animais controlo não vacinados, com elevados níveis de virémia e sintomatologia clínica concordantes com replicação viral, exibem uma maior frequência de IFN- γ -SC. Face a uma infecção natural pelo PCV2, a resposta mais elevada no grupo controlo pode ser explicada pelo facto de as IFN- γ -SC se desenvolverem sobretudo em resposta às proteínas Cap e Rep. Após vacinação com as vacinas comerciais só serão esperadas respostas à proteína estrutural do PCV2, uma vez que todas elas se baseiam na proteína Cap ou no vírus inactivado (Fort, 2009; Martelli et al., 2011). Além disso, a ausência de respostas imunitárias celulares após um desafio de campo nos animais vacinados pode tratar-se de uma prova da quantidade e

qualidade dos NA. Uma vez que o vírus é eficazmente neutralizado por estes anticorpos antes de poder alcançar as células, não consegue induzir uma resposta celular importante, explicando-se também assim a ausência de virémia nos animais vacinados (Eggen, 2010).

2.9.1.6. Perspectivas para novos produtos vacinais

Apesar de as vacinas comerciais disponíveis no mercado exibirem uma boa eficácia, sabe-se que, actualmente e a nível mundial, o genótipo PCV2b infecta com mais frequência os efectivos. Assim, vários autores (Lyyo et al., 2010; Darwich & Mateu, 2011; Beach et al., 2011; Shen, Halbur & Opriessnig, 2012) questionam a necessidade do desenvolvimento de vacinas baseadas neste genótipo e noutras variantes de PCV2 que de futuro possam surgir. O facto de as sequências nucleotídicas ao nível da ORF2 diferirem em cerca de 10% entre os genótipos PCV2a e PCV2b (Beach et al., 2011; Tribble & Rowland, 2012), agrava a preocupação sobre se as actuais vacinas comerciais, baseadas exclusivamente no genótipo PCV2a, protegem totalmente contra a infecção pelo genótipo PCV2b. Muito recentemente, um estudo norte-americano propôs a identificação da prevalência e a análise dos genótipos de PCV2 relativas aos anos 2010 e 2011, cerca de 5 anos após a difusão de programas vacinais nos EUA. Os resultados obtidos sugerem que o PCV2b continua a ser mais prevalente que o PCV2a nos casos de PCVD e que, nos efectivos vacinados, a circulação de PCV2b é comum, pelo que a adopção de uma estratégia vacinal baseada neste genótipo é de considerar (Shen et al., 2012).

Embora as vacinas inactivadas e de subunidades possuam vantagens em termos de estabilidade e segurança, existem outras tecnologias que se revelaram capazes de estimular respostas imunitárias anti-PCV2 e de prevenir a infecção viral (Beach & Meng, 2012). Algumas estratégias utilizam moléculas de ARN que neutralizam o PCV2 infeccioso e interferem com a sua replicação *in vitro*. Contudo, muitas das implicações clínicas destas terapêuticas antivirais são desconhecidas, sobretudo devido a problemas de distribuição *in vivo* e aos custos proibitivos a que estão associadas (Beach & Meng, 2012).

No geral, as vacinas vivas atenuadas estimulam uma imunidade humoral e celular indutora de níveis de protecção mais elevados que os alcançados pelo uso das vacinas inactivadas ou de subunidades actualmente disponíveis para o controlo do PCV2 (Meeusen et al., 2007; McLachlan & Dubovi, 2011b; Beach & Meng, 2012). O processo de atenuação mais comumente utilizado consiste na passagem seriada da estirpe selvagem em culturas celulares homólogas ou heterólogas, implicando a acumulação de substituições nucleotídicas no genoma viral que conduzem a uma diminuição da virulência. Fenaux et al. (2004a), ao sujeitarem uma estirpe selvagem de PCV2 a 120 passagens numa cultura de células PK-15, observaram duas mutações no gene da cápside que resultaram na sua atenuação *in vivo* e se manifestaram sob a forma de uma menor virémia e de uma menor gravidade das lesões associadas ao PCV2 nos animais experimentalmente inoculados.

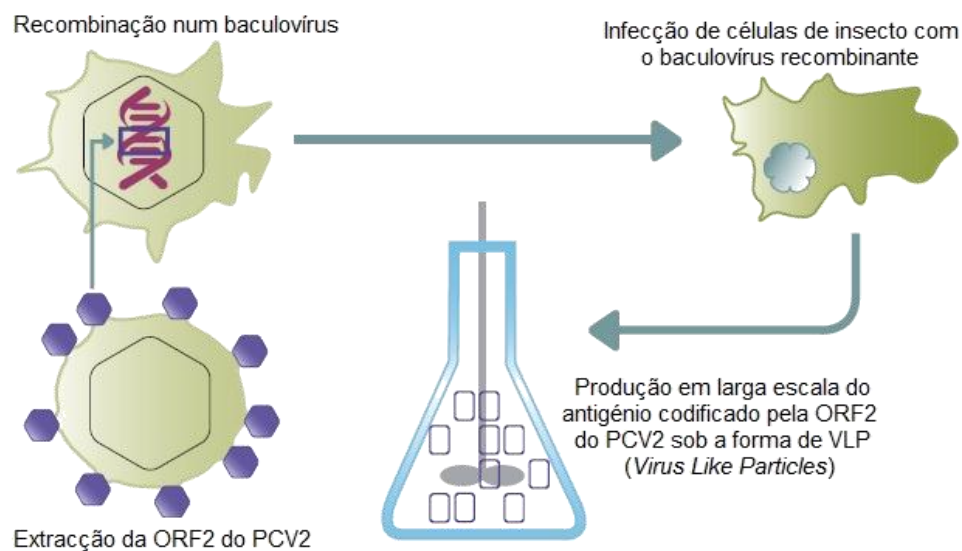
Deste modo, o vírus atenuado poderia constituir um óptimo candidato para uma vacina viva atenuada. Contudo, deve considerar-se uma potencial desvantagem desta estratégia - a subatenuação - com potencial reversão para o fenótipo patogénico causador de doença (Meeusen et al., 2007; McLachlan & Dubovi, 2011b). Uma alternativa mais segura para o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas consistirá no uso de PCV1 e PCV2 quiméricos. Apesar da diferença fenotípica, PCV1 e PCV2 são geneticamente próximos e possuem uma organização genómica similar (Finsterbusch & Mankertz, 2009). Um vírus quimérico PCV1-2a, contendo a cápside do PCV2a no esqueleto genómico do PCV1, revelou-se simultaneamente atenuado *in vivo*, imunogénico e geneticamente estável, fornecendo protecção similar e simultânea face a desafios com PCV2a e PCV2b (Fenaux et al., 2004b), sendo a base de uma vacina comercial actualmente disponível nos EUA e Canadá. Mais recentemente, assistiu-se ao desenvolvimento e avaliação de outro vírus quimérico resultante da clonagem da cápside do PCV2b no esqueleto do PCV1 (PCV1-2b) como potencial integrante de uma vacina viva modificada contra o PCV2. O vírus PCV1-2b inoculado em leitões privados de colostro e nascidos de cesariana mostrou-se atenuado, não provocou doença clínica e gerou menos virémia, menor carga viral e menos lesões linfóides comparativamente ao vírus selvagem PCV2b (Beach et al., 2011). Posteriormente, suínos convencionais vacinados com o mesmo vírus quimérico atenuado revelaram-se protegidos de desafios com PCV2a e PCV2b, exibindo menor incidência e gravidade de lesões microscópicas linfóides, menor carga viral e menos virémia; o facto de induzir uma imunidade protectora contra o PCV2b e uma imunidade cruzada contra o PCV2a, torna este vírus quimérico um potencial candidato ao desenvolvimento de uma nova vacina viva atenuada (Beach et al., 2011). Sumariamente, os estudos experimentais com estas vacinas baseadas em vírus quiméricos indicam que PCV1-2a e PCV1-2b são atenuados *in vivo* e induzem uma imunidade protectora de largo espectro em suínos convencionais, podendo ser adequadas à utilização em efectivos produtores. Contrariamente ao tradicional processo de atenuação por múltiplas passagens da estirpe selvagem em culturas celulares, a estratégia do vírus quimérico elimina as preocupações de uma possível reversão de virulência (Beach & Meng, 2012).

O uso do ADN do PCV2 como estimulante de respostas imunitárias específicas tem vindo a ser estudado em suínos e em ratos. A inoculação directa de ADN genómico dimerizado resultou numa infecção activa similar à inoculação com PCV2 infeccioso vivo (Fenaux et al., 2004b), como consequência da expressão do antigénio viral na sua forma nativa (McLachlan & Dubovi, 2011b). A administração intramuscular de ADN plasmídico, comportando genoma quimérico PCV1-2, induziu imunidade protectora em suínos (Fenaux et al., 2004b), podendo este ser potencialmente utilizado como uma vacina de ADN. A principal vantagem da utilização deste tipo de vacinas consiste na sua facilidade de produção em larga escala, o que permitirá uma redução considerável do seu custo de fabrico, para além da sua elevada

estabilidade e segurança (Meeusen et al., 2007; McLachlan & Dubovi, 2011b). A administração intramuscular de ADN plasmídico codificando genes individuais do PCV2 também estimulou respostas imunitárias específicas contra o vírus em suínos e ratos (Beach & Meng, 2012). Apesar de o futuro da aplicação destes compostos depender, em muito, de questões regulamentares, a aprovação recente do uso de uma vacina de ADN para protecção contra o vírus da encefalite equina representa uma oportunidade para a introdução no mercado de produtos similares contra outros vírus (Meeusen et al., 2007; McLachlan & Dubovi, 2011b; Beach & Meng, 2012).

As actuais vacinas comerciais de subunidades utilizam um sistema de expressão de baculovírus onde a proteína da cápside é expressa (Figura 10).

Figura 10. Expressão do antígeno ORF2 do PCV2 utilizando um sistema de baculovírus como vector (Fonte: Intervet Schering-Plough Animal Health, 2009)



Contudo, muitos outros métodos de expressão para produção e distribuição de antígenos têm sido explorados, nomeadamente vectores eucarióticos (leveduras, células de mamíferos), bactérias, vírus ou células vegetais (McLachlan & Dubovi, 2011b). Por exemplo, a disposição de epítomos imunodominantes da cápside do PCV2 na superfície de bacteriófagos lambda foi utilizada na vacinação de suínos, estimulando de forma bem sucedida a produção de uma resposta imunitária humoral e celular e NA anti-PCV2 (Hayes, Gamage & Hayes, 2010). Diversos estudos com vacinas vectoriais utilizando agentes infecciosos para a distribuição dos antígenos virais revelaram que a utilização de vírus recombinantes (como adenovírus) ou estirpes bacterianas atenuadas (por exemplo, *Bordetella bronchiseptica*) expressando a proteína da cápside do PCV2, consegue gerar respostas humorais eficazes contra o vírus. Após desafio com o PCV2, os suínos vacinados exibiram um melhor desempenho produtivo e uma diminuição da carga viral e da gravidade das lesões linfóides, comparativamente aos não vacinados (Wang, Jiang, Li, Jiang & Dong, 2007; Kim et al., 2009). Não obstante o seu potencial de indução de fortes respostas

imunitárias anti-PCV2, as vacinas vectoriais podem acarretar uma potencial reversão de virulência, para além de uma possível imunidade vectorial pré-existente que pode interferir com a vacinação (Beach & Meng, 2012).

A natureza ubiquitária do PCV2 na grande maioria dos efectivos justifica o desenvolvimento de uma vacina de marcadores que permita a distinção entre anticorpos gerados após infecção natural e anticorpos vacinais. A capacidade de detecção e selecção selectiva de genes de um determinado agente patogénico permite o desenvolvimento de vacinas de marcadores as quais, conjuntamente com testes diagnósticos apropriados, permitem a diferenciação entre animais vacinados e infectados (*differentiating infected from vaccinated animals* - DIVA). A expressão de novos epítomos na superfície do PCV2 infeccioso e de vírus quiméricos PCV1-2a tem sido estudada como abordagem alternativa à produção de vacinas de marcadores (Beach & Meng, 2012).

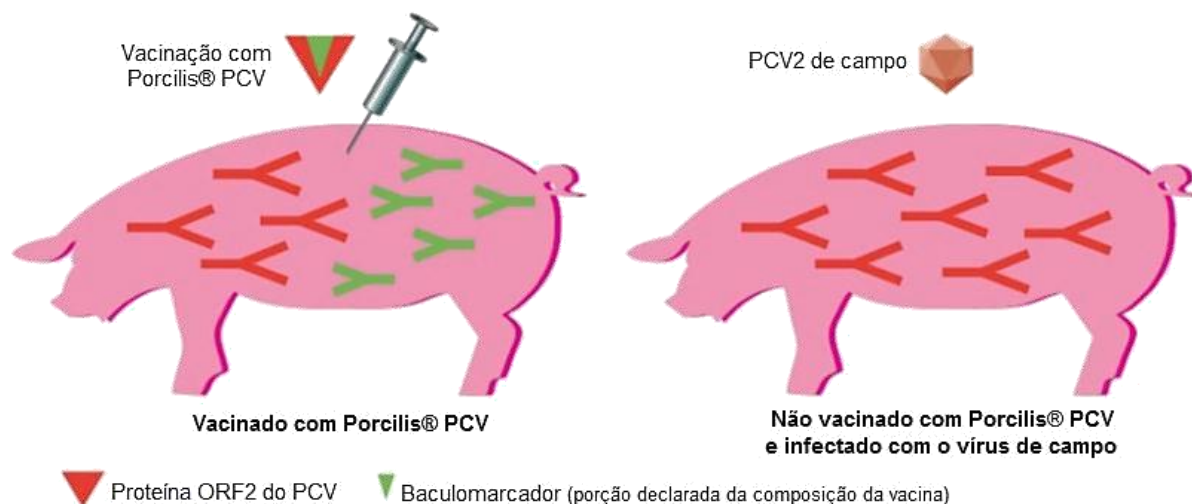
Também a utilização de vectores de expressão bem caracterizados permite que animais inoculados com vacinas recombinantes de subunidades sejam distinguidos de animais não vacinados (McLachlan & Dubovi, 2011b). Muito recentemente assistiu-se à concepção de um kit ELISA - BacuCheck™ ELISA - especialmente destinado à confirmação do estado vacinal de suínos imunizados especificamente com Porcilis® PCV através da detecção de anticorpos contra os baculovírus utilizados na produção da proteína da cápside codificada pela ORF2, que compõe as vacinas (Ladinig et al., 2011). Através de um sistema de expressão de baculovírus, a proteína é produzida em células de artrópodes; assumindo que os baculovírus só infectam invertebrados e que o antigénio baculovírus só é detectável em suínos após administração de uma vacina que o contenha, pode concluir-se que os anticorpos anti-baculovírus servem como prova de vacinação (Kuehn et al., 2011) (Figura 11). Este é o único produto actualmente disponível que permite a confirmação da correcta utilização de uma vacina comercial.

O conceito económico inerente ao BacuCheck™ consiste em fornecer aos produtores uma ferramenta de controlo da vacinação, permitindo-lhes verificar a qualidade da aplicação da vacina (dose correcta e momento apropriado). Consequentemente, os produtores de leitões conseguem provar a protecção dos animais através de testes laboratoriais e da emissão de um certificado, o que constitui uma prova economicamente viável que pode ser utilizada no comércio de importação e exportação, contribuindo para a criação de laços de confiança na cadeia comercial (produtores de leitões para engordas) (MSD Santé Animale, 2011).

Segundo as indicações do fabricante, recomenda-se a colheita de 10 amostras de sangue por banda, em tubos apropriados para o efeito. A colheita deve ser efectuada em leitões que tenham sido vacinados com Porcilis® PCV no mínimo há 3 semanas e com não mais que 12 semanas de idade isto porque, segundo Ladinig et al. (2011), os suínos podem contactar com baculovírus durante o período de engorda, factor que pode influenciar os resultados de BacuCheck® ELISA. Depois do correcto processamento, as amostras são analisadas com

dois testes distintos: um teste de detecção de anticorpos anti-PCV2, que pesquisa anticorpos contra a cápside do vírus, codificada pelo gene ORF2 (Synbiotics Serelisa® PCV-2 Ab Mono Blocking ELISA); e um teste de detecção de anticorpos baculomarcadores (BacuCheck® ELISA).

Figura 11. Identificação de animais vacinados e não vacinados com Porcilis® PCV (Adaptado de MSD Santé Animale, 2011)



O teste Bacucheck® ELISA efectua a classificação da amostra segundo o rácio S/P (*sample to positive ratio*). A vacinação só é validada quando se obtém um valor médio de S/P superior a 0,3 e pelo menos 80% das amostras positivas. Note-se que é obtido um resultado individual negativo quando $S/P < 0,3$ e um resultado individual positivo quando $S/P \geq 0,3$. Como a interpretação dos valores exige a conjugação de três parâmetros, a vacinação só é considerada bem sucedida quando, simultaneamente à obtenção de valores adequados de Bacucheck® ELISA, se obtém um título médio superior a 1800 no teste Synbiotics Serelisa® PCV-2 Ab Mono Blocking ELISA (MSD Santé Animale, 2011).

1. Objectivos

Após introdução das primeiras vacinas comerciais contra o PCV2, os médicos veterinários e os produtores têm vindo a desenvolver protocolos de vacinação alternativos com o intuito de maximizar a eficácia vacinal e otimizar o retorno do investimento. Desse modo, apesar das recomendações dos fabricantes, podem observar-se diferenças entre os diversos sistemas produtivos no que respeita à idade no momento da vacinação ou, inclusivamente, ao volume aplicado e/ou à estratégia de administração das doses vacinais.

Tradicionalmente, a grande maioria dos produtores prefere administrar as vacinas no momento do desmame como forma de economizar trabalho e tempo e diminuir o *stress* associado a duplas manipulações.

No entanto, a imunidade demora várias semanas a desenvolver-se totalmente após a vacinação e adiá-la até ao momento do desmame pode deixar os leitões temporariamente desprotegidos nas primeiras semanas após deixarem a maternidade, pelo que alguns preferem fazê-lo ainda mais precocemente, por exemplo, enquanto realizam outras operações de manejo. Contudo, a vacinação de animais muito jovens enfrenta vários desafios devido à imaturidade do seu sistema imunitário e à potencial interferência dos MDA presentes no momento da imunização.

A vacinação após o desmame pode também ser uma estratégia a considerar, mas a ocorrência de reacções moderadas a sistémicas resultantes da vigorosa estimulação do sistema imunitário após a imunização inicial pode afectar ainda mais o desempenho produtivo nas primeiras semanas da recria, para além de que a protecção dos leitões poderá ser perigosamente protelada para o momento em que a infecção pelos agentes de campo normalmente ocorre ou já ocorreu, o que poderá afectar a qualidade da imunização se já tiver ocorrido seroconversão previamente à vacinação.

Sendo o desmame considerado um dos momentos mais críticos da produção suína, representando um período de adaptação a factores de perturbação simultâneos, a alteração do momento da vacinação relativamente a este acontecimento pode aplicar-se de forma a minimizar os efeitos da imunoactivação no crescimento, podendo revelar-se estratégica quando os animais experienciam múltiplos factores de perturbação num tão curto período de tempo. Tendo em conta estas permissas, os principais objectivos do presente estudo foram:

- i) Avaliar qual de dois momentos de vacinação dos leitões contra o PCV2 - 5 dias antes do desmame e 5 dias após o desmame - é o mais adequado, tendo em conta parâmetros zootécnicos e imunitários;
- ii) Confirmar a ocorrência de hipertermia e comportamentos de menores ingestão e actividade física após vacinação;
- iii) Aferir sobre a qualidade da imunização dos animais através da utilização de um kit ELISA concebido para detecção de anticorpos anti-baculovírus.

2. Materiais e Métodos

2.1. Exploração, animais e alojamento

O presente ensaio de campo decorreu na zona centro oeste de Portugal, na Azambuja, numa exploração de ciclo fechado de 500 reprodutoras que trabalha numa base semanal (Figura 12). Todas as reprodutoras são rotineiramente vacinadas contra ADV, PRRSV, SIV, *Escherichia coli*, *Streptococcus suis*, PPV e *Erysipelothrix rhusiopathiae*. As marrãs são vacinadas contra ADV, PRRSV, SIV, PPV, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e PCV2 na quarentena. Os leitões são vacinados contra PCV2 e Mh 5 dias antes do desmame e contra ADV às 12 semanas de idade.

Figura 12. Exploração em estudo



Os leitões são desmamados às 4 semanas de idade e mudados para a recria, onde permanecem até perto das 9/10 semanas de idade (Figura 13). Os suínos de cada desmame são dispostos numa sala de 8 parques, cada um com capacidade para aproximadamente 30 leitões. Cada parque é separado entre si por uma grade metálica, ocorrendo contacto nasal e oral entre animais de parques adjacentes. O pavimento é constituído por estrados de PVC e o aquecimento é efectuado por termoventiladores eléctricos, sendo o controlo ambiental (temperatura e ventilação) realizado por um dispositivo electrónico devidamente programado. Cada parque dispõe de um bebedouro de concha e de um comedouro *tube-o-mate*; durante a primeira semana de permanência dos animais nestas instalações é adicionado um comedouro de prato, para que se adaptem mais facilmente ao novo sistema de alimentação (Figura 14).

Nesta exploração, em particular, foi adoptado um sistema de “pré-engorda”, ou seja, os leitões são movimentados da recria não directamente para a engorda, mas para módulos de

fibra e cimento adjacentes à recria, onde continuam, sensivelmente, até às 13 semanas de idade. Findo este período, os animais são transferidos para a engorda, onde permanecem até ser atingido o seu peso final de abate, perto das 24 semanas de idade. Preferencialmente, os grupos formados na recria e “pré-engorda” são mantidos aquando da transferência para a engorda, de modo a evitar perturbações na hierarquia social, estando cada parque projectado para acolher cerca de 30 animais. O pavimento destas instalações consiste em grelhas de cimento. Já a ventilação é assegurada por um sistema estático com janelas de abertura regulável e não existe sistema de aquecimento, sendo os animais sujeitos a grandes amplitudes térmicas.

Figura 13. Instalações de recria



Figura 14. Sistemas de alimentação na recria



Os animais doentes são inicialmente identificados pelos trabalhadores com base na sua atitude e/ou sinais clínicos, sendo alvo de tratamentos individuais prescritos pelo médico veterinário responsável sempre que se justifique. Entre as entidades clínicas mais comuns na recria destacam-se artrites e/ou meningites por *Streptococcus suis*, diarreia e sintomatologia respiratória, as quais exigem a administração intramuscular de fármacos como ceftiofur, amoxicilina, penicilina procaína+estreptomicina, dexametasona, enrofloxacin e tulatromicina. Na engorda registam-se sobretudo afecções respiratórias, sendo o seu tratamento efectuado com tilosina, incorporada no alimento. Os produtos comerciais são utilizados de acordo com as recomendações constantes no seu “Resumo das Características do Medicamento”.

Na exploração em estudo, a vacinação contra PCV2 nos leitões iniciou-se em 2011 com o objectivo de melhorar os parâmetros produtivos, na medida em que não se observava PCV2-SD explícita.

Particularmente na engorda, entre as 18 e as 20 semanas de idade, os animais começavam a evidenciar sintomatologia coincidente com infecção aguda por *Actinobacillus pleuropneumoniae* e/ou *Lawsonia intracellularis*, o que se reflectia num crescimento afectado e em alguma heterogeneidade entre lotes. O médico veterinário responsável

atribuiu estes acontecimentos a uma possível imunossupressão secundária à infecção subclínica por PCV2.

A análise retrospectiva dos dados de desempenho produtivo revelou que no primeiro semestre de 2011, antes do início da vacinação, se registavam taxas de mortalidade de 6% e 3,65% na recria e na engorda, respectivamente. No período homólogo de 2012, estando a vacinação contra o PCV2 já incluída no plano sanitário da exploração, a mortalidade desceu para 3,2% (-47%) na recria e 2,3% (-40%) na engorda. Refira-se, no entanto, que no segundo semestre de 2011 as instalações de recria foram totalmente remodeladas, o que se poderá ter reflectido na descida da mortalidade verificada nesta fase do ciclo produtivo. Ainda assim, o decréscimo da mortalidade na engorda, sector no qual se registavam os maiores problemas, foi bastante importante, permitindo concluir acerca do efeito benéfico da vacinação na exploração em questão e efectuar um “diagnóstico terapêutico”.

2.2. Protocolo experimental

Este estudo incluiu inicialmente 453 leitões (machos e fêmeas) de 2 desmames consecutivos, provenientes de 47 ninhadas de 47 porcas.

No dia da inclusão, o peso corporal individual foi registado (Figura 15) e os leitões numerados individualmente através da colocação de um brinco (Figura 16) e distribuídos pelos dois grupos de tratamento, grupo A (vacinação 5 dias antes do desmame), e grupo B (vacinação 5 dias após o desmame), à medida que eram apanhados manualmente de forma sequencial (A-B-A-B-A-B...). Esta atribuição continuou sequencialmente pelas ninhadas.

Um peso corporal inferior a 4,5 kg aquando da primeira pesagem foi o único critério de exclusão do estudo.

A identificação da porca, a sua paridade e a data do parto foram registadas. Os detalhes referentes aos grupos em estudo encontram-se listados na tabela 8.

Figura 15. Pesagem individual



Figura 16. Colocação dos brincos



Tabela 8. Dados descritivos dos grupos em estudo

	Grupo A	Grupo B
Momento de inclusão		
Número de animais	227	226
Número de ninhadas	47	47
Peso corporal médio (kg) \pm d.p.	6,1 \pm 1,01	6,0 \pm 0,94
Idade média à vacinação (dias) \pm d.p.	21,4 \pm 3,03	31,5 \pm 3,02

À inclusão (Tabela 8), os animais do grupo A foram inoculados por via intramuscular, no lado direito do pescoço e de acordo com as instruções do fabricante, com uma dose de 2 ml de Porcilis® PCV (MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands), contendo a proteína da cápside de PCV2a expressa num sistema de baculovírus, suspensa num adjuvante constituído de α -tocoferol e parafina líquida; e uma dose de 2 ml de M+PAC® (MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands), composta de Mh inativado em óleo mineral e hidróxido de alumínio (Figura 17). Os animais pertencentes ao grupo B permaneceram não vacinados. Cinco dias depois da inclusão, ao desmame, os leitões de ambos os grupos de tratamento foram movidos para as instalações de recria e mantidos na mesma sala, mas em parques separados de acordo com o brinco, de modo a assegurar que o alojamento se dava em condições semelhantes. Todos os leitões receberam o mesmo alimento e foram sujeitos às mesmas práticas de manejo.

Cinco dias depois do desmame e subsequente entrada na recria (Tabela 8) os animais do grupo B foram inoculados por via intramuscular com uma dose de 2 ml de Porcilis® PCV (MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands) e uma dose de 2 ml de M+PAC® (MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands) no lado esquerdo do pescoço, de acordo com as instruções do fabricante (Figura 17).

Figura 17. Vacinação com Porcilis® PCV e M+PAC® na maternidade e na recria



O peso corporal individual de todos os animais incluídos no estudo foi aferido no dia da inclusão e 45 dias depois.

O cálculo do GMD foi efectuado com base no GMD dos animais vivos no fim da segunda pesagem que não tivessem perdido os brincos no decurso do ensaio; o valor foi obtido através do quociente do ganho de peso pelo número de dias decorridos entre a primeira e a segunda pesagens.

O estudo terminou quando os animais completaram 22 semanas de idade.

2.3. Monitorização dos parâmetros clínicos e colheita de amostras

Os leitões foram clinicamente monitorizados algumas horas após a vacinação para detecção de eventuais reacções adversas vacinais, nomeadamente reacções locais no ponto de injeção (tumefacções duras), reacções de hipersensibilidade sistémica e depressão da actividade e da ingestão.

Cerca de 5 horas após cada vacinação, a temperatura corporal foi medida por via rectal com um termómetro digital num número limitado de indivíduos vacinados (n=115) e não vacinados (n=115) nesse dia (Figura 18).

Figura 18. Medição da temperatura rectal

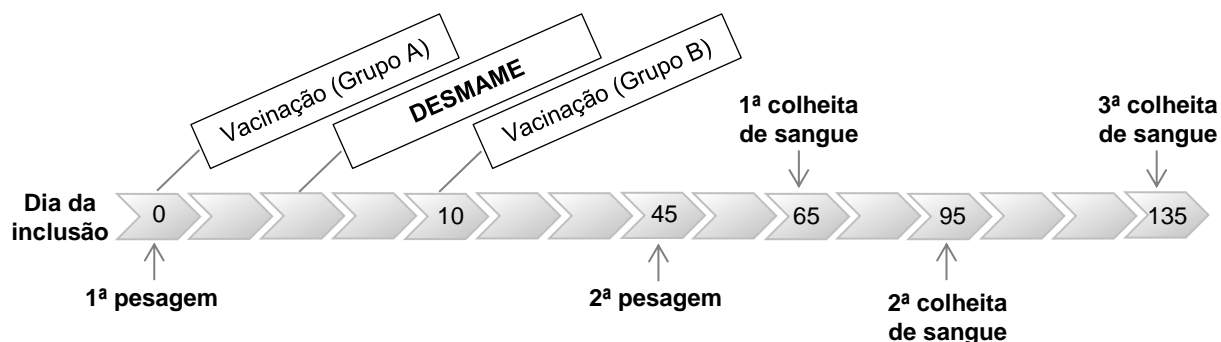


Sempre que se realizaram tratamentos concomitantes, o número de animais tratados dentro de cada grupo foi registado diariamente. O número de administrações de medicamentos foi utilizado como parâmetro de avaliação da morbilidade.

Os animais mortos ou que necessitaram ser eutanasiados por razões de bem-estar animal foram registados também numa base diária. A taxa de mortalidade foi calculada através do quociente entre o número de indivíduos mortos e o número de indivíduos inicialmente presentes no dia de entrada na recria.

Realizaram-se colheitas de sangue em cada grupo de tratamento para detecção e quantificação de anticorpos anti-PCV2 e anticorpos baculomarcadores. Assim, foram colhidas amostras nos mesmos 20 animais de cada grupo às 12, 16 e 22 semanas de idade. O cronograma dos eventos decorridos no estudo é exibido na figura seguinte.

Figura 19. Cronograma dos acontecimentos decorridos no estudo



2.4. Determinação do título de anticorpos anti-PCV2 e de baculomarcadores

As amostras de sangue colhidas às 12 e às 16 semanas de idade foram devidamente processadas e os soros obtidos enviados para o único laboratório acreditado pela MSD Animal Health para a detecção de anticorpos baculomarcadores, o Synlab.vet GmbH, em Leipzig, na Alemanha. Os soros foram analisados com dois objectivos distintos:

- Detecção e quantificação de IgG anti-PCV2 através de um kit de ELISA, com pesquisa de anticorpos dirigidos contra a nucleocápside do PCV2: Synbiotics Serelisa® PCV-2 Ab Mono BlockingELISA;
- Detecção de anticorpos baculomarcadores com Bacucheck® ELISA. Tal como já referido, o teste Bacucheck® ELISA efectua a classificação da amostra segundo o rácio S/P (*sample to positive ratio*) médio, definido por

$$\frac{\text{Densidade óptica (DO) amostra} - \text{DO controlo negativo}}{\text{DO controlo positivo} - \text{DO controlo negativo}}.$$

Os resultados do teste Bacucheck® ELISA foram validados quando se obtiveram valores médios de S/P superiores a 0,3 e pelo menos 80% das amostras positivas.

Como o diagnóstico da correcta utilização de Porcilis® PCV exige a conjugação de três parâmetros, a vacinação só foi considerada bem sucedida quando, simultaneamente à obtenção de valores adequados no teste Bacucheck® ELISA, se obteve um título médio superior a 1800 no teste Synbiotics Serelisa® PCV-2 Ab Mono BlockingELISA (MSD Santé Animale, 2011).

A quantificação do valor individual de anticorpos anti-PCV2 nas amostras de soro recolhidas às 22 semanas de idade foi realizada no laboratório Ovislab S.L., Llinars del Vallès, Espanha, através de metodologia devidamente validada.

2.5. Análise estatística

Os parâmetros em estudo (peso final e ganho médio diário dos leitões do ensaio) foram submetidos a análise estatística recorrendo ao PROC GLM (General Linear Model) do SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

As porcas das quais estes leitões derivaram foram distribuídas por 4 classes de acordo com a sua paridade: “primíparas” (1 barriga), “jovens” (2 a 3 barrigas), “meia idade” (4 a 5 barrigas) e “velhas” (6 ou mais barrigas).

O modelo utilizado incluiu o peso inicial como covariável, e o efeito da classe de paridade, da porca dentro da classe de paridade e do tratamento. O efeito do lote de desmame foi testado, mas não foi incluído no modelo final por não contribuir para explicar a variabilidade dos resultados.

Foram elaboradas tabelas, nas quais se apresentam as médias ajustadas pelo modelo LSMEAN (*Least Square Means*), as diferenças entre LSMeans e os erros padrões. As diferenças entre LSMeans para os tratamentos foram computadas recorrendo ao comando *Estimates* do GLM.

Adicionalmente, recorreu-se ao programa R® versão 2.15.0 (R Development Core Team, 2012) e sua extensão Rcmdr versão 1.8-4.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado na avaliação da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas “peso inicial” e “temperatura”. Como estas não seguiam uma distribuição normal, utilizou-se o teste não-paramétrico *Wilcoxon Rank Sum Test* para comparação das médias de peso inicial entre grupos experimentais e de temperaturas entre animais vacinados e não vacinados.

O teste de Qui-Quadrado foi aplicado para comparação da morbilidade e da mortalidade nos grupos experimentais e para o apuramento de uma eventual associação entre os valores obtidos e a pertença ou não a determinado grupo experimental.

Para todas as análises, o leitão foi utilizado como unidade experimental. A significância foi estabelecida para $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Reacções adversas à vacinação

Em nenhum dos animais de ambos os grupos experimentais se observaram, após vacinação, reacções de hipersensibilidade sistémica imediatas (as mais comuns sintomas neurológicos menores, como tremores e/ou excitação) ou reacções locais transitórias.

Cerca de 5 horas após a vacinação, os leitões encontravam-se pouco activos e prostrados, exibindo uma diminuição da ingestão de alimento (Figura 20). Simultaneamente, registou-se um aumento da temperatura rectal média na ordem dos 1,7°C comparativamente ao valor fisiológico para leitões nesta faixa etária (39,2°C) (Tabela 9).

Considerando que a vacinação ocorreu em momentos distintos nos dois grupos, os animais do grupo não vacinado (grupo A ou grupo B) exibiram, no dia da vacinação do outro grupo, uma temperatura rectal, em média, 1,3°C inferior à dos animais vacinados, ligeiramente acima do valor fisiológico referido (Tabela 9).

As diferenças de temperatura rectal média verificadas entre animais vacinados e não vacinados são estatisticamente significativas (*Wilcoxon Rank Sum Test*, $P < 0,0001$) (Anexo 1).

Figura 20. Reacções adversas à vacinação



Na imagem da direita, observe-se a diferença de comportamento entre animais não vacinados (parques da esquerda) e vacinados (parques da direita)

Tabela 9. Avaliação da temperatura rectal em animais vacinados e não vacinados

	Não vacinados n=115	Vacinados n=115	Valor de P
Amplitude (°C)	37,7 - 41,3	39,5 - 42,0	
Temperatura média (°C) \pm d.p.	39,6 \pm 0,60	40,9 \pm 0,55	<0,0001

3.2. Morbilidade e mortalidade entre grupos experimentais

Em ambos os grupos, durante o período de recria, registaram-se condições clínicas variadas que exigiram tratamentos individuais (Tabela 10).

A morbidade variou consoante o desmame em questão (o ensaio experimental foi realizado com leitões de dois desmames consecutivos). O número de tratamentos individuais requeridos na recria foi mais elevado para o primeiro desmame, com 63 tratamentos individuais nos leitões do grupo A e 14 nos do grupo B. No segundo desmame a morbidade decresceu consideravelmente, tendo-se procedido ao tratamento individual de apenas 1 leitão do grupo A e 2 do grupo B. A ocorrência de diarreia foi a entidade clínica que mais tratamentos individuais exigiu em ambos os grupos experimentais.

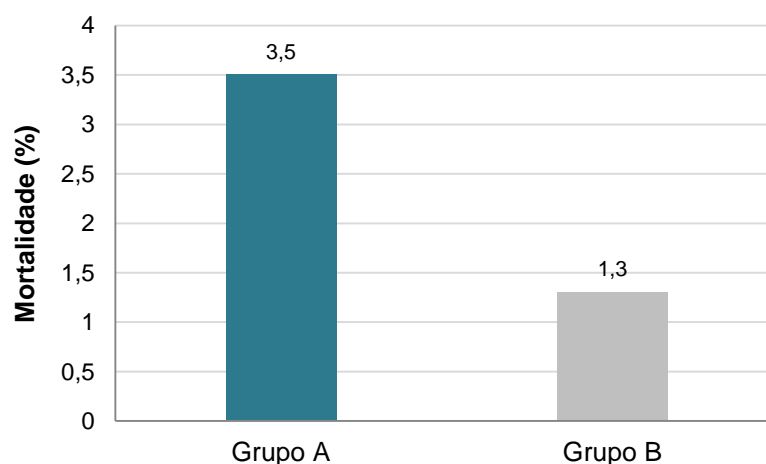
Tabela 10. Entidades clínicas que exigiram tratamento durante a permanência dos animais na recria

	Grupo A		Grupo B	
	<i>fr</i>	<i>fr (%)</i>	<i>fr</i>	<i>fr (%)</i>
Emagrecimento	1/227	0,4	2/226	0,9
Diarreia	61/227	26,9	13/226	5,8
Artrite	2/227	0,9	0/226	0
Meningite	0/227	0	1/226	0,4
Total	64/227	28,2	16/226	7,1

Assim sendo, a taxa de morbidade foi mais elevada nos leitões pertencentes ao grupo A, tendo cerca de 28% dos indivíduos sido alvo de tratamentos individuais. Os animais pertencentes ao grupo A receberam 4 vezes mais tratamentos individuais durante o período de permanência na recria que os do grupo B (64 tratamentos contra 16 tratamentos); de acordo com a análise estatística utilizando o teste de Qui-quadrado, as diferenças registadas foram significativas ($P < 0,0001$) (Anexo 2).

De modo a avaliar possíveis efeitos da vacinação na taxa de mortalidade na recria, as taxas de mortalidade referentes a ambos os grupos foram comparadas (Figura 21).

Figura 21. Análise da taxa de mortalidade na recria



A mortalidade foi mais elevada no grupo A que no grupo B (8 mortos em 227 animais contra 3 mortos em 226 animais). Contudo, a análise estatística efectuada não revelou a existência

de diferenças significativas entre ambos os grupos (teste de Qui-quadrado; $P=0,149$) (Anexo 2), pelo que, nas condições do presente ensaio, pode concluir-se não existir associação entre os factores mortalidade e inclusão num ou noutro grupo de tratamento.

3.3. Comparação dos pesos iniciais e finais e do ganho médio diário entre grupos

O peso inicial (no dia da inclusão no estudo) não diferiu significativamente entre os membros dos grupos experimentais A e B (*Wilcoxon Rank Sum Test*; $P=0,574$) (Anexo 3).

O peso final (no 45º dia pós-inclusão, à segunda pesagem) e o GMD foram considerados parâmetros mensuráveis que permitiram aferir sobre o efeito do momento da vacinação no crescimento dos indivíduos.

A tabela 11 exhibe o peso final e o GMD dos animais do grupo A e do grupo B para o intervalo de tempo compreendido entre a primeira pesagem (dia da inclusão no estudo) e a segunda pesagem (à saída da recria, 40 dias após o desmame). Foram considerados apenas os pesos dos animais que mantiveram os brincos até ao dia da segunda pesagem.

Tabela 11. Peso final à saída da recria e GMD para o intervalo dia de inclusão-saída da recria (global)

	Grupo A n=121	Grupo B n=94	Diferença	Valor de P
Peso final (kg) \pm d.p.	19,97 \pm 0,217	19,12 \pm 0,251	+0,85 \pm 0,321	0,009
GMD (g/dia) \pm d.p.	311 \pm 4,8	292 \pm 5,6	+19 \pm 0,7	0,009

O peso final e o GMD diferiram significativamente entre os dois grupos ($P=0,009$) (Anexo 4), tendo-se observado um melhor desempenho produtivo nos leitões do grupo A, vacinados 5 dias antes do desmame.

Tendo a taxa de morbilidade sido mais elevada nos animais pertencentes ao grupo experimental A, apesar do melhor desempenho produtivo observado, tentou perceber-se se o elevado número de tratamentos com antibióticos a que estes foram sujeitos terá beneficiado o GMD e, consequentemente, o peso final. Para tal, analisou-se separadamente o peso final e o GMD dos leitões do grupo experimental A pertencentes ao primeiro e ao segundo desmames (Tabela 12).

Tabela 12. Peso final à saída da recria e GMD para o intervalo dia de inclusão-saída da recria nos animais do grupo experimental A

	Grupo A 1º desmame	Grupo A 2º desmame	Valor de P
Peso final (kg) \pm d.p.	20,10 \pm 0,362	20,29 \pm 0,329	0,695
GMD (g/dia) \pm d.p.	312 \pm 8,0	316 \pm 7,3	0,695

Apesar do maior número de tratamentos individuais registado nos animais do grupo A pertencentes ao primeiro desmame (63 tratamentos individuais), podendo eventualmente neles observar-se algum benefício da terapêutica antibiótica, na realidade não se observou qualquer tipo de vantagem relativamente ao segundo desmame ($P=0,695$) (Anexo 5), o que vai de encontro ao estabelecido pelo modelo de análise de covariância aplicado, o qual demonstrou a inexistência de associação entre o peso final e o GMD e a inclusão no primeiro ou segundo desmame.

No segundo desmame, no qual a utilização de antibióticos ficou limitada a apenas um leitão do grupo A e dois do grupo B, observou-se uma clara vantagem produtiva dos leitões do primeiro grupo ($P=0,020$) (Tabela 13), (Anexo 6), a qual poderá explicar a vantagem produtiva global dos animais do grupo experimental A (Tabela 11).

Tabela 13. Peso final à saída da recia e GMD para o intervalo dia de inclusão-saída da recia nos animais do segundo desmame

	Grupo A	Grupo B	Diferença	Valor de P
Peso final (kg) \pm d.p.	19,97 \pm 0,287	18,92 \pm 0,343	+1,05 \pm 0,443	0,020
GMD (g/dia) \pm d.p.	312 \pm 6,4	289 \pm 7,6	+23 \pm 9,8	0,020

3.4. Resposta serológica após vacinação contra o PCV2

Por não terem sido efectuadas colheitas de sangue previamente à vacinação, o estatuto imunitário inicial dos leitões permaneceu desconhecido. Às 12 semanas de idade foram realizadas colheitas de sangue em 20 indivíduos de cada um dos grupos experimentais para detecção e quantificação de anticorpos anti-PCV2 e detecção de anticorpos baculomarcadores. Os resultados são expostos na tabela 14.

Tabela 14. Resposta serológica pós-vacinação (12 semanas de idade)

	Bacucheck® ELISA		Synbiotics Serelisa® PCV-2 Ab Mono Blocking ELISA
	Rácio S/P médio	% positivos	Título médio
Grupo A	0,91	100	9141
Grupo B	0,96	100	10129

De acordo com os critérios definidos pelos fabricantes dos testes realizados, a interpretação combinada dos resultados de Bacucheck® ELISA e de Synbiotics Serelisa® indica que Porcilis® PCV foi correctamente utilizada a nível grupal nos animais do grupo A e do grupo B. As ligeiras diferenças observadas entre os dois grupos ao nível do rácio S/P médio e título médio de anticorpos anti-PCV2 não foram valorizadas, sobretudo devido à totalidade de amostras positivas para anticorpos baculomarcadores em ambos (100%).

Contrariamente ao aconselhado pelos fabricantes da vacina comercial contra o PCV2 utilizada no presente ensaio experimental, optou por realizar-se uma análise adicional às 16 semanas de idade. Os resultados obtidos, apresentados na tabela 15, evidenciam que, comparativamente às 12 semanas de idade, às 16 semanas de idade os animais de ambos os grupos exibiram uma resposta serológica crescente face à proteína da cápside viral. Além disso, o rácio S/P médio aumentou nas amostras referentes ao grupo B, mas diminuiu nas do grupo A. Ainda assim, a percentagem de amostras positivas manteve-se constante das 12 para as 16 semanas de idade.

Tabela 15. Resposta serológica pós-vacinação (16 semanas de idade)

	Bacucheck® ELISA		Synbiotics Serelisa® PCV-2 Ab Mono BlockingELISA
	Rácio S/P médio	% positivos	Título médio
Grupo A	0,85	100	12137
Grupo B	1,12	100	14270

Às 22 semanas de idade, no final do presente estudo, realizou-se uma colheita adicional de sangue. Desta vez, contrariamente ao título médio de anticorpos anti-PCV2 e à detecção de anticorpos baculomarcadores, aferiu-se apenas o título de anticorpos anti-PCV2 individual num número limitado de leitões de cada um dos grupos experimentais (Figura 22 e Tabela 16).

Figura 22. Comparação do título de anticorpos anti-PCV2 entre os grupos experimentais A e B (22 semanas de idade)

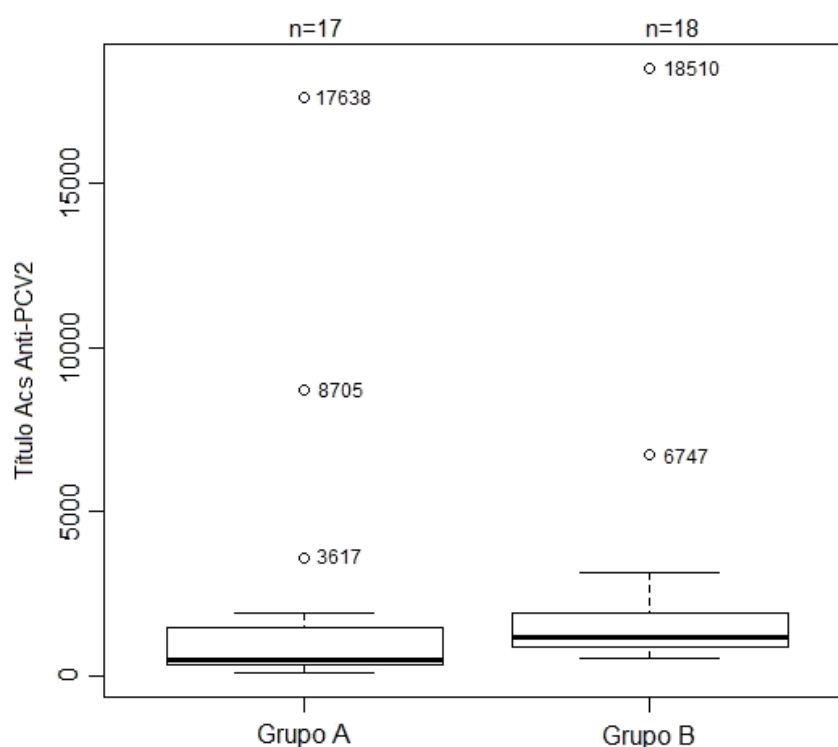


Tabela 16. Estatística descritiva: comparação do título de anticorpos anti-PCV2 entre os grupos experimentais A e B (22 semanas de idade)

	Média	Q1 (25%)	Q2 (50%)	Q3 (75%)
Grupo A	2288,82	349	484	1487
Grupo B	2601,33	882,5	1178	1882,5

Salienta-se a existência de títulos médios na mesma ordem de grandeza nos animais de ambos os grupos, embora a mediana do grupo B (1178) tenha sido mais elevada que a do grupo A (484). Foram detectados valores extremos correspondentes a cinco indivíduos, 3 pertencentes ao grupo A e dois ao grupo B, com títulos de anticorpos anti-PCV2 moderados a muito altos.

4. Discussão

O uso de vacinas nos actuais sistemas de produção suína é uma prática comum, na medida em que o extremo grau de confinamento e a elevada densidade populacional favorecem o desenvolvimento de microrganismos patogénicos que interferem negativamente com a saúde do efectivo e a produção.

A necessidade de evitar manipulações excessivas enquanto se assegura uma protecção eficaz tem conduzido à utilização de antigénios vacinais combinados ou sistemas de aplicação múltipla. Tal acontece, por exemplo, com as vacinas contra o PCV2 e Mh, provavelmente as mais difundidas na produção suína mundial. A sinergia da infecção combinada pelos dois agentes (Ellis et al., 2004) exerce um grande impacto na saúde do efectivo, pelo que a vacinação simultânea contra ambos os organismos é realizada com o intuito de melhorar o desempenho produtivo.

A administração simultânea de Porcilis® PCV e M+PAC® por intermédio de sistemas de aplicação múltipla revelou-se segura e eficaz em termos serológicos, não existindo incompatibilidade ou interferência imunológica demonstradas entre os antigénios vacinais PCV2 e Mh (Eggen, Schmidt, Raes & Witvliet, 2010; Farreres et al., 2010). Os dados destes estudos confirmam que não só a vacinação contra Mh se reflectiu numa maior redução de lesões pulmonares comparativamente aos grupos controlos, como os leitões seroconverteram à vacinação para o PCV2, exibindo títulos de anticorpos anti-PCV2 acima do limiar protector proposto por Fort et al. (2009b).

Muitas vezes a interferência entre os antigénios vacinais resulta na diminuição da resposta imunitária, o que não se verificou no presente estudo. Os resultados combinados de Bacucheck® ELISA e de Synbiotics Serelisa® às 12 semanas de idade confirmam-no, permitindo concluir acerca da correcta vacinação dos animais (100% de amostras positivas, rácio S/P médio superior a 0,3 e título médio de anticorpos anti-PCV2 superior a 1800).

A actual produção comercial de suínos envolve variadas práticas que acarretam um grau variável de *stress* nos animais. Indiscutivelmente, o factor de perturbação mais importante na vida de um suíno é o desmame, o qual envolve mudanças abruptas e disruptoras da homeostasia orgânica.

O desmame comercial implica alterações nutricionais (alteração de uma dieta líquida de leite, altamente digerível e rica em potentes biorreguladores da estrutura e função intestinais, para uma dieta sólida, diferente na textura e composição e separada fisicamente da fonte de água); ambientais (flutuações da temperatura ambiente, características do sistema de alojamento, higiene ambiental); sociais (separação da mãe e dos irmãos, mistura com indivíduos desconhecidos); e físicas (transporte, adaptação aos novos sistemas de alimentação e abeberamento) (Pluske, Le Dividich & Hampson et al., 2006; Rueda, 2011; Kick et al., 2011). Deste modo, o desmame conduz a uma intensa taxação de processos adaptativos, tanto a nível comportamental como endócrino. Consequentemente, observa-se

uma diminuição do consumo de alimento nos dias posteriores ao desmame - anorexia pós-desmame, que abranda o ritmo de crescimento do leitão e origina uma significativa perda de peso que pode acompanhar-se de problemas digestivos (Rueda, 2011). O leitão recém-desmamado geralmente perde peso de forma considerável durante os 2 primeiros dias após o desmame (acima de 10% do seu peso vivo), podendo não o recuperar até passada uma semana (Rueda, 2011). Pluske, Williams & Aherne (1995, citados por Williams, 2003), e Pluske et al. (2006), concluíram que muitas vezes os leitões levam entre 2 a 3 semanas a recuperar a ingestão de energia e o crescimento ao mesmo nível que tinham antes do desmame, exibindo um défice energético que pode ser potenciado pela imunoactivação causada, por exemplo, por programas vacinais. A extensão da queda da taxa de crescimento após o desmame depende de quão rápido o leitão se consegue adaptar às novas circunstâncias e recuperar a homeostasia.

A mistura de leitões é uma prática habitual após o desmame, implicando uma alteração da hierarquia social estabelecida e um aumento do comportamento agonístico após reagrupamento, conduzindo a alterações da saúde, do bem-estar e dos índices produtivos (Sotillo & Méndez, 2007). Em condições de produção intensiva, os leitões lutam vigorosamente para excluir os indivíduos estranhos ao grupo, o que pode afectar o rendimento produtivo nas 2 a 4 primeiras semanas pós-desmame. A mistura de indivíduos reflecte-se num aumento do nível de agressões entre os mesmos (vocalizações, movimentos de cabeça, agressões de boca aberta), o que eleva a tensão social do grupo e tem como repercussões a diminuição do rendimento zootécnico, o aumento das lesões físicas e o aumento das infecções (Figura 23).

Figura 23. Comportamento agonístico e lesões derivadas de lutas observados na recria durante o ensaio experimental



É debatível se a vacinação, o acto em si, representará ou não um factor de perturbação para o leitão; contudo, como referido, a maioria das vacinações em leitões ocorre perto de ocasiões nas quais são submetidos a eventos perturbadores, como o desmame. Adicionalmente, os suínos são tipicamente vacinados em grupo e no mesmo momento, pelo

que as vocalizações dos outros indivíduos e a presença de trabalhadores da exploração no local podem representar importantes factores de perturbação (Kick, Tompkins & Almond, 2011).

Além do acto de vacinação, a activação do sistema imunitário que dele provém resulta numa resposta imunitária que afecta as vias homeostáticas reguladoras do metabolismo, a distribuição dos nutrientes, a actividade do eixo hipotálamo-hipofisário e o comportamento. Esta imunoactivação tem consequências importantes, que incluem a produção de citocinas pró-inflamatórias, hipertermia, inapetência, reabsorção de aminoácidos do músculo e redireccionamento de nutrientes do crescimento para o anabolismo de proteínas de fase aguda e para as células imunitárias, levando a importantes efeitos na produção (Colditz, 2002). Deste modo, existe um custo metabólico associado ao desenvolvimento da imunidade. Schinckel et al. (1995) determinaram que a imunoactivação por antigénios, incluindo vacinas, administrados a leitões desmamados afectou as suas taxas de crescimento e de ingestão comparativamente a leitões controlos não expostos a antigénios durante o período de recria.

No presente estudo, embora não se tenham observado reacções de hipersensibilidade sistémica nem reacções locais, algumas horas após a administração das vacinas registou-se um aumento da temperatura corporal (aumento médio de 1,7°C), acompanhado da diminuição da actividade e da ingestão e do aumento da procura de fontes de aquecimento. Embora a vacinação seja frequentemente encarada como um procedimento inócuo, podem observar-se reacções adversas após a sua execução. Reacções sistémicas ligeiras, como hipertermia transitória, anorexia e depressão dos parâmetros produtivos são frequentes durante períodos de tempo relativamente curtos após a vacinação. Geralmente, o efeito pirogénico dos antigénios vacinais e dos adjuvantes é o responsável por estes acontecimentos (Martinod, 1995; EMA, 2009; Heegaard et al., 2011). Aliás, a possibilidade da ocorrência destes efeitos é contemplada nos folhetos informativos dos produtos comerciais utilizados no presente ensaio experimental, sendo de esperar “diminuição da ingestão do alimento até um máximo de 5 dias” e “uma diminuição passageira da taxa de crescimento no período imediato após a administração da vacina” (EMA, 2010a). Como tal, os adjuvantes possuem a capacidade de afectar o crescimento e o conforto do animal pois, embora benéficos para a apresentação dos antigénios e produção de respostas imunitárias eficazes, o dano tecidual decorrente da sua utilização tem a capacidade de produzir uma resposta inflamatória responsável pela redução da ingestão e da taxa de crescimento (Potter, 2010). Contudo, poucos ou nenhuns estudos têm sido realizados no sentido de apurar se esta redução temporária é característica de todas as vacinas comerciais contra PCV2 e Mh ou das estratégias vacinais utilizadas.

Assim, apesar de a hipertermia ter durado, no máximo, entre 24 a 48 horas, poderá ter sido suficiente para perturbar o crescimento dos leitões de ambos os grupos experimentais durante alguns dias após a vacinação.

Dado que a vacinação dos animais do grupo A se processou antes do desmame, estes fenómenos transitórios de hipertermia e, crê-se, quebra de crescimento, poderão ter contribuído para um balanço energético negativo que prejudicou uma melhor adaptação ao desmame, intrinsecamente desafiante. No entanto, não tendo os leitões do grupo A sido submetidos a desafios ambientais (por terem permanecido na maternidade após a vacinação), conseguiram ultrapassar estes efeitos mais facilmente que os do grupo B, vacinados já na recria, e por isso sujeitos ao processo de adaptação às novas instalações e condições ambientais em curso.

No caso dos leitões do grupo B, a depressão de crescimento esperada após a vacinação, antecedida da perda de peso tipicamente associada ao desmame, das quais começaram a recuperar a menos dias da segunda pesagem que os leitões do grupo A, pode ter contribuído para os seus menores peso médio final ao 45º dia pós-inclusão e GMD no período considerado.

Não obstante o papel perturbador do desmame, em 2007 começaram a surgir os primeiros relatos de uma dificuldade acrescida em fazer que os suínos se comesçassem a alimentar imediatamente após serem desmamados; este aumento pareceu coincidir com a difundida adopção da vacinação contra o PCV2, o que indica que esta pode contribuir para dificultar a introdução do alimento na recria (Potter, 2010). Trabalhos recentes sugerem que a vacinação contra PCV2 e Mh no dia do desmame ou alguns dias depois pode ser seguida de uma redução transitória do desempenho na recria (Kane et al., 2008; Bergstrom et al., 2009), pelo que o afastamento temporal da vacinação relativamente ao desmame pode afirmar-se como alternativa aos tradicionais protocolos vacinais, mais associados a uma depressão temporária do crescimento.

Apesar de a mortalidade na recria ter sido mais elevada no grupo A que no grupo B, a análise estatística demonstrou a inexistência de qualquer efeito significativo relacionado com o protocolo vacinal a que os animais foram sujeitos ($P=0,149$). A taxa de mortalidade obtida para o grupo experimental A (3,5%) insere-se na tendência registada na exploração, cuja taxa de mortalidade média da recria ronda os 3,2%. Contudo, a maior taxa de mortalidade observada no grupo A pode ser uma consequência da também mais elevada morbilidade registada nestes animais.

Antagonicamente, o número de tratamentos individuais (como parâmetro de avaliação da morbilidade) diferiu significativamente entre grupos experimentais ($P<0,0001$). Os leitões do grupo A receberam 4 vezes mais tratamentos que os do grupo B, sendo a diarreia a entidade clínica que no geral mais intervenções exigiu. Este acontecimento é difícil de explicar, na medida em que a ocorrência de diarreia se registou quase exclusivamente no

primeiro desmame (em 61 leitões do grupo A e 12 leitões do grupo B). No segundo desmame o tratamento contra a diarreia foi requerido em apenas um animal, do grupo B. Além disso, a vacinação habitual contra PCV2 e Mh na exploração decorre de acordo com o protocolo utilizado no grupo experimental A, sem que se tenham registado surtos de diarreia como o que se verificou. Provavelmente tratar-se-á de um acontecimento pontual, sem qualquer ligação com o protocolo experimental aplicado.

A hipótese de se tratar de uma enterite inespecífica ou por agentes patogénicos entéricos (nomeadamente *Escherichia coli*) decorrente das alterações estruturais e funcionais do tracto gastrointestinal impostas pelo desmame é possível, embora não explique por que razão os animais do primeiro desmame foram mais atingidos, e por que razão os do grupo A o foram mais que os do grupo B no primeiro desmame. Outras possíveis justificações para este acontecimento podem incluir a ocorrência de erros de manejo (incorrecta lavagem, desinfecção e/ou secagem das instalações antes da entrada dos animais, por exemplo) ou falhas nos dispositivos electrónicos de controlo das condições ambientais sem que os funcionários da exploração se tenham apercebido de tal.

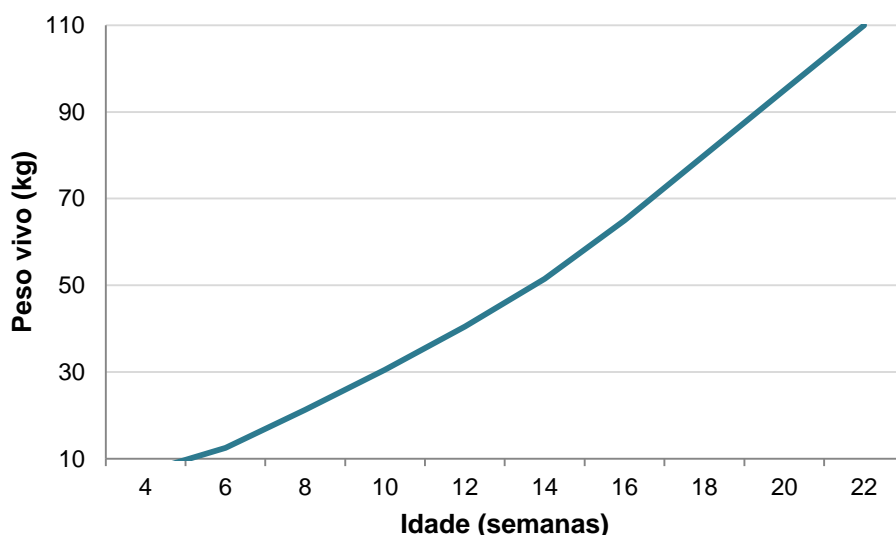
Analisando estes aspectos, há que ponderar se o facto de os leitões do grupo A terem apresentado, aparentemente, um melhor desempenho produtivo que os do grupo B, se deve ao maior número de tratamentos antimicrobianos a que foram sujeitos.

As fluoroquinolonas, nomeadamente a enrofloxacina, utilizada no presente estudo para tratamento individual contra a diarreia, são frequentemente utilizadas na indústria produtora suína na prevenção ou tratamento de doenças entéricas. Contudo, ao actuarem sobre as bactérias do tracto gastrointestinal, produzem efeitos benéficos, como aumento do crescimento e da eficiência alimentar (Modi et al., 2011). Este efeito benéfico foi descrito por vários autores, entre eles Callesen (2003), que reportou uma diminuição do ganho médio diário e um aumento da mortalidade após suspensão do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em leitões de recria. No entanto, a análise dos parâmetros produtivos dos grupos experimentais A e B apenas no segundo desmame, onde a taxa de tratamentos individuais não diferiu significativamente entre grupos, revelou a continuação da existência de uma vantagem produtiva para o grupo A relativamente ao peso final (+1,05 kg que o grupo B) e ao GMD (+23 g/dia que o grupo B) ($P=0,020$). Além disso, a análise independente dos parâmetros produtivos para os animais do grupo experimental A pertencentes ao primeiro e ao segundo desmames não revelou qualquer vantagem para os animais mais sujeitos a tratamentos antibióticos (primeiro desmame) relativamente ao peso final e ao GMD ($P=0,695$). De facto, para que se verifique um efeito promotor do crescimento, a aplicação destas moléculas deve ser prolongada no tempo, nomeadamente por via oral; no caso do presente ensaio, os tratamentos foram realizados por via parentérica e limitaram-se a cerca de duas administrações intramusculares por animal.

Interessantemente, a vantagem observada para o grupo experimental A parece decorrer apenas do desempenho no segundo desmame, uma vez que a análise dos parâmetros produtivos no primeiro desmame não revela diferenças significativas entre grupos experimentais ($P=0,137$) (Anexo 7). Estes dados permitem excluir os tratamentos antibióticos como justificação para a melhor *performance* observada no grupo A, tendo a ocorrência de diarreia comprometido a optimização do crescimento dos leitões de ambos os grupos experimentais no primeiro desmame.

O peso corporal médio no momento da segunda pesagem para os leitões de ambos os grupos (19,97 kg para o grupo A e 19,12 kg para o grupo B) encontra-se abaixo dos valores de peso vivo esperados para leitões na faixa etária das 9/10 semanas de idade (Figura 24). No entanto, como referido, é de considerar a influência do surto agudo de diarreia neste parâmetro. Além disso, as curvas de crescimento são, por norma, algo padronizadas, pelo que podem observar-se diferenças entre sistemas produtivos consoante as condições de manejo e de alimentação e as linhas genéticas utilizadas, por exemplo.

Figura 24. Curva de crescimento para suínos de recria e engorda (Adaptado de Carr, 1998)



Face aos resultados obtidos, pode afirmar-se que o crescimento dos leitões do grupo A e do grupo B foi alvo de uma perturbação exercida não só pelo desmame, como também pela vacinação.

A vacinação como factor perturbador foi aplicada em momentos distintos relativamente ao desmame e à segunda pesagem nos dois grupos experimentais. A localização temporal da vacinação relativamente ao desmame é importante, permitindo explicar, em parte, a razão pela qual os leitões do grupo A apresentaram um peso final médio e um GMD superiores aos do grupo B.

Como referido, a vacinação origina uma imunoactivação que se traduz numa mobilização de nutrientes do crescimento para a função das células imunitárias. Este efeito ter-se-á prolongado durante vários dias, enquanto os leitões do grupo A tentavam readquirir a

homeostasia prévia; porém, durante esta recuperação, interpôs-se novo evento causador de perturbação, o desmame. Confrontados com as alterações impostas, os animais ter-se-ão visto obrigados ao dispêndio de energia adicional para adaptação às novas condições ambientais, alimentares, sociais e físicas. O seu crescimento terá sido afectado simultaneamente pela vacinação e pelo desmame, fruto da diminuição da taxa de ingestão e do dispêndio energético decorrente da imunoactivação. Posteriormente, ter-se-á iniciado a recuperação da homeostasia, acompanhada de um processo de crescimento compensatório que lhes permitiu recuperar algum do peso corporal perdido até à segunda pesagem.

O crescimento compensatório é um fenómeno fisiológico bem descrito em suínos, nos quais a restrição alimentar durante um determinado período é seguida de uma fase de crescimento acelerado após reintrodução de alimento *ad libitum*. Os suínos produzidos em condições intensivas raramente são expostos a uma restrição alimentar, excepto em fases precoces do seu desenvolvimento, nomeadamente antes e imediatamente após o desmame. Ao desmame os factores de *stress* são geralmente suficientes para conduzir a ingestão a níveis muito baixos, reduzindo o crescimento a zero ou a valores negativos, situação após a qual o crescimento compensatório poderá ocorrer (Williams, 2003).

No grupo B poderá ter ocorrido algo semelhante. No entanto, comparativamente ao grupo A, o desmame e a vacinação (como perturbadores do equilíbrio homeostático) encontram-se mais próximos do momento da segunda pesagem. Após o início da recuperação do desmame, estes leitões ficaram sujeitos à imunoactivação decorrente da vacinação, contribuindo para o exacerbamento do balanço energético negativo; dada a proximidade da segunda pesagem, os animais pouco tempo terão tido para iniciar o crescimento compensatório após recuperação da homeostasia, o que se reflectiu num menor peso final no 45º dia pós-inclusão.

O peso do leitão ao desmame, ou imediatamente após o desmame, parece ser o principal determinante do crescimento nas fases de recria e de engorda. Tokach, Goodband, Nelssen & Kats (1992) reportaram que o GMD durante a primeira semana pós-desmame exerce um grande impacto ($P < 0,001$) no crescimento em fases subsequentes do desenvolvimento. Assim, suínos que registaram um GMD superior naquele período eram, em média, mais pesados na segunda semana pós-desmame que os suínos que não ganharam peso na primeira semana após o desmame. Por outro lado, ao exibirem um peso mais elevado também na engorda, estes indivíduos permaneceram menos dias nesta fase, consumindo menos alimento, o que se traduziu numa vantagem económica evidente.

No presente ensaio, seria de esperar que a perturbação e a imunoactivação, decorrentes da vacinação, nos leitões do grupo A tivessem afectado o crescimento nos dias subsequentes, contribuindo para um peso ao desmame inferior ao dos leitões do grupo B. No entanto, o facto de os leitões do grupo A terem exibido um peso médio final de recria superior ao dos do grupo B (19,97 kg contra 19,12 kg) ($P = 0,009$) parece apontar para uma menor

importância da perturbação induzida pela vacinação comparativamente à induzida pelo desmame e à adaptação ao mesmo. Já Moon, Han, Gentry, Parmentier & Schrama (1999) haviam provado que nem sempre a génese de uma resposta imunitária compromete o metabolismo energético e o desempenho produtivo, podendo o *stress* induzido aos suínos encaixar nos limites fisiológicos por eles tolerados. No que se refere ao presente trabalho, terá sido o que aconteceu com os leitões do grupo A, que lidaram relativamente bem com a perturbação decorrente da vacinação, apresentando um peso final mais elevado no final da recria, como reflexo de um peso possivelmente inalterado no momento do desmame.

Sendo o crescimento na primeira semana após o desmame considerado um factor de risco para o subsequente desempenho na recria, pode especular-se que a perturbação e o custo metabólico da vacinação 5 dias após o desmame nos leitões do grupo B, acompanhado de uma inevitável diminuição da *performance*, exerceu efeitos a mais longo prazo nestes animais, o que justificou o seu menor peso médio final no momento da segunda pesagem.

A existência de momentos de pesagem adicionais poderia ajudar a determinar qual o grupo experimental mais afectado imediatamente após a vacinação; no entanto, também estes procedimentos podem ter um carácter perturbador da homeostasia, razão pela qual foram evitados no presente ensaio.

As diferenças ao nível do desempenho produtivo observadas entre os grupos A e B podem igualmente ter uma explicação relacionada com o carácter da infecção por PCV2. Como referido anteriormente, o PCV2 replica-se preferencialmente em células em divisão, afectando o desenvolvimento de vários sistemas orgânicos, entre eles o sistema imunitário e o tracto gastrointestinal. Os danos no sistema imunitário podem, por exemplo, facilitar a ocorrência de infecções secundárias, acompanhadas de atrasos no crescimento. Deste modo, o ganho de peso em animais jovens pode ser considerado o reflexo do efeito do vírus em células em rápida divisão, necessárias ao desenvolvimento individual (Kurmman et al., 2011). O facto de os leitões do grupo A terem sido vacinados contra o PCV2 10 dias antes dos do grupo B, pode ter-lhes assegurado uma protecção mais precoce contra a infecção viral e os efeitos dela decorrentes, contribuindo para que, à segunda pesagem, exibissem um peso corporal mais elevado e um melhor GMD. Neste sentido, uma colheita de sangue para detecção de ácido nucleico viral, por qPCR, no momento da segunda pesagem, poderia ter-se revelado útil na quantificação do vírus nos animais dos dois grupos experimentais, o que permitiria aferir sobre a eficácia virológica do momento de realização de cada um dos protocolos vacinais.

Para além da vacinação como intervenção perturbadora, ocorrem modificações neuroendócrinas em resposta à perturbação provocada pelo desmame e a alterações do metabolismo energético que podem justificar eventuais falhas vacinais. É, pois, usual um aumento dos níveis plasmáticos de cortisol, independente da idade a que ocorre o desmame (Borghetti et al., 2006; Kick, Tompkins, Flowers, Whisnat & Almond, 2012). Este

acontecimento está frequentemente associado a um fenómeno de diminuição transitória das concentrações de linfócitos no sangue periférico (*lymphocytic trapping*), que apresenta potencial para influenciar a resposta à vacinação (Kick et al., 2011). Assim, o sistema imunitário solicitado pela vacina poderá então não estar em condições de responder normalmente. De Groot, Ruis, Scholten, Koolhaas & Boersma (2001) relataram, por exemplo, a supressão da resposta imunitária primária a uma vacina viral como resposta a factores de *stress*, nomeadamente a mistura de suínos desconhecidos, reconhecendo que o momento de aplicação do factor perturbador relativamente à vacinação influencia a magnitude e a direcção do seu efeito na resposta imunitária.

No presente ensaio experimental, a qualidade da vacinação parece não ter sido afectada pelo momento da sua execução, como comprovam os resultados de Bacucheck® ELISA e de Synbiotics Serelisa® às 12 semanas de idade. Seria esperado que os leitões pertencentes ao grupo B pudessem apresentar algum prejuízo da resposta humoral à imunização, como eventual resultado dos processos adaptativos endócrinos decorrentes do desmame a que estavam ainda sujeitos no momento da vacinação, o que não se verificou. De facto, a imunossupressão associada ao desmame é frequentemente limitada a um breve período de tempo (Kick et al., 2012), o que pode permitir explicar a ausência de interferência com o desenvolvimento de uma resposta imunitária humoral adequada. Todavia, tal não invalida a hipótese de existirem leitões incorrectamente imunizados, não incluídos na amostra analisada.

Dado o carácter ubiqüitário do PCV2, a interpretação dos dados serológicos é complexa. Os dados da análise de títulos individuais de anticorpos anti-PCV2 às 22 semanas indicam a existência de um nível de protecção mais ou menos homogéneo entre os indivíduos pertencentes ao mesmo grupo experimental e títulos médios na mesma ordem de grandeza entre grupos experimentais (2289 para o grupo A e 2602 para o grupo B). A excepção são, obviamente, os valores extremos registados em ambos os grupos, que poderão atribuir-se a uma eventual circulação do vírus de campo. No entanto, esta explicação não justifica a razão de os restantes indivíduos, interessantemente, não terem seroconvertido ao mesmo nível que aqueles que exibiram os títulos mais elevados de anticorpos anti-PCV2. Assim, os indivíduos aos quais correspondem os valores extremos observados, poderão tratar-se de leitões que responderam inadequadamente à vacinação os quais, após contacto com o vírus de campo, exibiram uma seroconversão abrupta. Aliás, o início da circulação do vírus selvagem parece ter ocorrido antes das 16 semanas de idade, observando-se um aumento progressivo dos títulos médios de anticorpos anti-PCV2 no teste Synbiotics Serelisa® entre as 12 e as 16 semanas de idade.

A imunossupressão devida a imaturidade do sistema imunitário também pode conduzir a situações de falha vacinal. Regra geral, os leitões são capazes de montar respostas inatas e adquiridas ao nascimento. Contudo, qualquer resposta adquirida montada pelo recém-

nascido deverá consistir numa resposta primária com um período de retardamento mais ou menos prolongado e baixas concentrações de anticorpos, de forma a poupar o leitão (Tizard, 2004; G. Almond, comunicação pessoal, Maio, 2012). A protecção precoce conferida pela maioria das vacinas baseia-se grandemente em mecanismos dependentes da produção de anticorpos, sendo a sua eficácia determinada pelo grau e qualidade da resposta humoral (EMEA, 2007). Deste modo, a eficácia da imunização a uma idade precoce pode ser prejudicada por uma menor e mais curta resposta activa à vacinação. Seria igualmente de esperar que os leitões do grupo A, confrontados com um estímulo antigénico vacinal a uma idade mais precoce, exibissem uma menor magnitude da resposta imunitária, o que não se verificou, observando-se uma resposta humoral de grau semelhante entre grupos experimentais às 12 semanas de idade. Contudo, no momento da primeira colheita de amostras para análise serológica, e após a consequente maturação imunitária, os leitões do grupo A poderiam já ter seroconvertido ao mesmo nível dos do grupo B, o que explica a ausência de diferenças significativas ao nível da resposta humoral entre grupos experimentais.

Na tentativa de assegurar uma protecção precoce no momento da primeira vacinação, mesmo na presença de MDA, os fabricantes têm-se empenhado no desenvolvimento de produtos que permitam a imunização de animais cada vez mais jovens (EMEA, 2007; G. Almond, comunicação pessoal, Maio, 2012). Prova disso são os produtos comerciais utilizados no presente ensaio experimental, Porcilis® PCV e M+PAC®, concebidos para uma imunização muito precoce dos leitões, a partir dos 3 e dos 7 dias de idade, respectivamente.

Embora desempenhando um papel importante nos mecanismos protectores contra as doenças infecciosas durante a fase inicial da vida, os MDA podem interferir com a construção da imunidade activa como resposta à vacinação, representando um potencial prejuízo ao desenvolvimento de uma resposta humoral pós-vacinação. Mas, segundo O'Neill et al. (2011), o sistema imunitário dos suínos possui características únicas que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de uma resposta imunitária protectora após uma vacinação muito precoce.

Os resultados descritos na literatura relativamente à problemática dos MDA e da eficácia da vacinação são divergentes. Enquanto alguns autores relatam que animais MDA positivos vacinados às 3 semanas de idade respondem melhor à vacinação que animais vacinados, por exemplo, com 1 semana de idade (Palzer et al., 2010), outros defendem que, em situações de campo, a imunidade materna não ameaça a eficácia vacinal (Opriessnig et al., 2009c; Martelli et al., 2011). Já O'Neill et al. (2011) demonstraram que, imunizando leitões de 5 dias de idade com uma vacina comercial contra PCV2, estes seroconverteram de forma semelhante a leitões vacinados aos 21 dias com o mesmo produto, detectando-se a presença de NA 21 dias após a vacinação em ambos os casos. Contudo, os trabalhos de

O'Neill et al. (2011) decorreram com leitões *naïves* para PCV2, sendo que nas condições do presente ensaio experimental pode assumir-se que a maioria dos leitões vacinados, tanto do grupo A como do grupo B, seriam seropositivos devido à natureza ubiquitária do vírus e à presença de anticorpos anti-PCV2 no colostro das porcas.

Ainda considerando o presente ensaio experimental podem apenas fazer-se suposições, uma vez que não foram realizadas análises serológicas previamente à vacinação, as quais teriam permitido conhecer os títulos da imunidade adquirida passivamente. Especula-se que, na exploração em estudo, os níveis de MDA não sejam elevadíssimos, na medida em que apenas as marrãs são vacinadas contra PCV2 e as restantes reprodutoras estão expostas ao vírus de campo, o que se traduz em níveis mais ou menos variáveis de protecção fornecidos à descendência. Neste sentido, dado que a vacinação dos leitões do grupo A se realizou a uma idade média de 21 dias poderia esperar-se a ocorrência de interferência da imunidade de origem materna com a resposta imunitária activa gerada após a vacinação dos leitões. No entanto, uma vez mais, os resultados de Bacucheck® ELISA e Synbiotics Serelisa® às 12 semanas de idade comprovam que não houve prejuízo da imunização precoce dos leitões, observando-se níveis de seroconversão semelhantes entre os grupos experimentais, mesmo tendo os leitões do grupo B sido vacinados a uma idade média mais tardia (aproximadamente 32 dias de idade) e, por isso, num momento de maior maturidade do sistema imunitário e no qual a imunidade de origem materna não ameaçaria a qualidade da imunização.

Segundo Potter et al. (2009), o efeito negativo da vacinação contra PCV2 e Mh parece ser muito mais severo na recria que na engorda, onde os seus benefícios são claramente mais evidentes e as diferenças existentes entre diferentes estratégias vacinais utilizadas perto do desmame tendem a desaparecer. Esta é, aliás, a tendência observada nos poucos estudos realizados sobre a influência da estratégia de vacinação contra PCV2 e Mh no desempenho produtivo de suínos de recria e engorda (Kane et al., 2008; Bergstrom et al., 2009).

Assim, apesar de as duas diferentes estratégias vacinais utilizadas no presente ensaio experimental terem gerado resultados diferentes no que respeita ao desempenho produtivo na recria, será de esperar que na engorda a *performance* geral se iguale, diluindo-se as diferenças observadas entre os grupos experimentais A e B. Além disso, a ausência de diferenças significativas entre grupos em termos imunitários reforça esta teoria, podendo níveis de protecção imunitária semelhantes estar associados a desempenhos produtivos similares na fase de engorda.

Igualmente, importa considerar que o crescimento dos suínos se encontra dependente de muitos factores, mais do que da estratégia vacinal utilizada. O peso ao nascimento é um factor fundamental na maximização do crescimento futuro, e os produtores sabem que leitões mais pesados ao nascimento são mais pesados ao desmame e, em muitos casos, mais pesados ao abate. Esta associação foi, inclusivamente, detectada pelo modelo de

análise de covariância utilizado no presente estudo, verificando-se a existência de uma forte associação entre o peso inicial (ao dia da inclusão no estudo) e o peso final. Outra associação detectada pelo modelo de análise de variância diz respeito à paridade da porca e ao peso inicial (e, indirectamente, ao peso final à saída da recria), pois os leitões mais pesados no dia da inclusão derivaram tendencialmente de porcas “velhas”, enquanto que os mais leves tinham como mães porcas “primíparas” ($P < 0,001$) (Anexo 8).

5. Conclusão e considerações finais

A alteração do momento de vacinação pode ser uma estratégia a adoptar quando os indivíduos são expostos a múltiplos agentes perturbadores da homeostasia; no entanto, o momento da vacinação é muitas vezes definido em função do intervalo de tempo que decorre antes da exposição natural ao vírus, pelo que esta decisão deve ser extremamente bem ponderada, de modo a não comprometer a protecção dos leitões.

Os resultados obtidos neste trabalho podem adicionar-se aos descritos na escassa literatura científica sobre esta temática, ajudando a aumentar o volume de informação acerca de estratégias alternativas aos tradicionais protocolos de vacinação utilizados na produção intensiva de suínos. A totalidade dos trabalhos desenvolvidos sobre este tema centra-se em estratégias vacinais no dia do desmame e/ou em vários dias após o mesmo, não avaliando o desempenho de suínos vacinados previamente a estes períodos de tempo. Além disso, a maioria destes estudos justifica as diferenças observadas com base nas características de diferentes vacinas comerciais utilizadas, não sendo os suínos dos vários grupos imunizados com o mesmo produto, o que gera situações de variabilidade.

Embora não se tenham registado diferenças significativas entre ambos os grupos experimentais em termos imunitários, a vacinação a uma idade mais baixa deverá garantir uma protecção mais precoce contra a infecção pelos agentes patogénicos considerados, assegurando uma imunidade duradoura até à idade do abate.

Aparentemente, e considerando as características da exploração em estudo, a vacinação antes do desmame é mais vantajosa que a vacinação após o desmame em termos zootécnicos, o que se reflectirá num menor período de permanência na engorda até ao peso de abate e, conseqüentemente, numa diminuição dos custos relacionados com a alimentação. Contudo, os efeitos positivos da vacinação antes do desmame nos resultados produtivos foram aferidos considerando um período muito limitado de tempo. Futuramente, o desempenho produtivo dos animais deverá ser acompanhado até ao momento do abate, avaliando-se a eventual diminuição ou anulação das diferenças observadas entre os protocolos vacinais; subseqüentemente, deverá realizar-se a devida avaliação económica.

Por ter sido realizado em condições de campo, com os naturais constrangimentos económicos e de mão-de-obra associados, alguns aspectos do delineamento experimental poderão ser melhorados em termos futuros. Devido ao elevado número de perdas de brincos registado, é aconselhável a utilização de um método de identificação mais fiável, nomeadamente a tatuagem do pavilhão auricular ou o recurso a materiais mais resistentes. Pelo facto de o objectivo primordial do estudo ter sido a análise do desempenho produtivo dos animais, a avaliação imunitária foi relegada para segundo plano, o que implica que se tenham falhado pontos de colheita de amostras importantes, nomeadamente antes da vacinação, tanto nos leitões como nas mães (para avaliação do grau de imunidade materna), e no período pós-vacinação a curto prazo.

Embora conveniente, a constituição de um grupo controlo não vacinado foi impraticável, visto o trabalho ter decorrido com suínos a ser posteriormente introduzidos na cadeia comercial. Pelas mesmas razões, foi também impossível a dissociação da vacinação contra PCV2 e Mh, pelo que será de considerar um efeito de carácter aditivo no que respeita à perturbação e à imunoactivação exercidas pela imunização simultânea contra os dois microrganismos.

Apesar de as vacinas comerciais utilizadas conferirem protecção comprovada contra os agentes considerados no presente estudo, o seu efeito negativo no desempenho da recria não pode ser menosprezado, devendo ser levado em conta aquando da concepção de estratégias vacinais. Num momento em que, cada vez mais, a indústria produtora de suínos exige a optimização do potencial de crescimento dos animais, a minimização do carácter aditivo dos factores de *stress* é essencial. Deste modo, a remoção de potenciais causas de perturbação, como o acto da vacinação e a imunoactivação dela decorrente, da proximidade de um dos momentos mais perturbadores da vida de um leitão, o desmame, deverá contribuir para a melhoria dos parâmetros produtivos assegurando, imperativamente, a adequada protecção dos animais.

Bibliografia

- Allan G.M., McNeilly F., Cassidy J.P., Reilly G.A.C., Adair B., Ellis W.A., McNulty M.S. (1995). Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology*, 44, 49-64.
- Allan G.M. & Ellis W.A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Intervention*, 12, 3-14.
- Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica - Apifarma (2010). A indústria farmacêutica em números, Edição 2010. Acedido em Jan., 24, 2012, disponível em: <http://www.apifarma.pt/publicacoes/ifnumeros/Documents/IFemN%C3%BAmoros2010.pdf>.
- Balmelli C., Steiner E., Moulin H., Peduto N., Herrmann B., Summerfield A. & McCullough K. (2011). Porcine circovirus type 2 DNA influences cytoskeleton rearrangements in plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, 132, 57-65.
- Bassaganya-Riera J., Pogranichniy R.M., Jobgen S.C., Halbur P.G., Yoon K.J., O'Shea M., Mohede I. & Hontecillas R. (2003). Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. *The Journal of Nutrition*, 133, 3204-3214.
- Beach N.M., Ramamoorthy S., Opriessnig T., Wu S.Q. & Meng X.J. (2011). Novel chimeric porcine circovirus (PCV) with the capsid gene of the emerging PCV2b subtype cloned in the genomic backbone of the non-pathogenic PCV1 is attenuated *in vivo* and induces protective and cross-protective immunity against PCV2b and PCV2a subtypes in pigs. *Vaccine*, 29, 221-232.
- Beach N.M. & Meng X.J. (2012). Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, 164, 33-42.
- Benchereau J. & Steinman R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 246-252.
- Bergstrom J.R., Potter M.L., Tokach M.D., Henry S.C., Dritz S.S., Nelssen J.L., Goodband R.D. & DeRouchey J.M. (2009). Effects of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination strategy, birth weight, and gender on postweaning performance of growing-finishing pigs reared in a commercial environment. *2009 Swine Day Report of Progress 1020, Kansas State University, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service*, 8-20. Acedido em Nov. 28, 2011, disponível em: <http://www.ksre.ksu.edu/library/lvstk2/srp1020.pdf>.
- Borghetti P., Ferrari L., Cavalli V., De Angelis E., Saleri R., Corradi A. & Martelli P. (2006). Effect of weaning and vaccinations on immune and hormonal parameters in neonatal piglets. *Veterinary Research Communications*, 30(1), 227-230.
- Brons N., Neto R., Vila T., Longo S. & Joisel F. (2010). Impact of Circovac® sow PCV2 vaccination on piglet weaning weight [versão electrónica]. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, p. 374. Acedido em Abr. 26, 2012 em: <http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2010/p2.pdf>.
- Brunborg I.M., Fossum C., Lium B., Blomqvist G., Merlot E., Jørgensen A., Eliasson-Selling L., Rimstad E., Jonassen C.M. & Wallgren P. (2010). Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds,

affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1):22.

Burch D. (2008). Porcine circovirus vaccines - where are we? *Pig Progress*, 24(6), 7-9.

Callesen J. (2003). Effects of termination of AGP-use on pig welfare and productivity [versão electrónica]. In *Working Papers for the WHO International Review Panels Evaluation, Foulum, Denmark*, World Health Organization, pp. 43-46.

Calsamiglia M., Fraile L., Espinal A., Cuxart A., Seminati C., Martín M., Mateu E., Domingo M. & Segalés J. (2007). Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Research in Veterinary Science*, 82, 299-304.

Carr J. (1998). *Garth pig stockmanship standards: growth rate*. Acedido em Jul. 28, 2012, disponível em: <http://www.thepigsite.com/stockstds/17/growth-rate>.

Chae C. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal*, 168, 41-49.

Chae C. (2005). A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, 169, 326-336.

Chang H.W., Jeng C.R., Lin T.L., Liu J.J., Chiou M.T., Tsai Y.C., Chia M.Y., Jan T.R. & Pang V.F. (2006). Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110, 207-219.

Charreyre C., Bésème S., Brun A., Bublot M., Lapostolle B., Sierra P. & Vaganay A. (2006a). Protection of piglets against a PCV2 experimental challenge by vaccinating gilts with an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine, Circovac®: serological, clinical and pathological aspects [versão electrónica]. In *Proceedings of the 19th IPVS Congress, 16-19 July, Copenhagen, Denmark*, p.176. Acedido em Abr. 26, 2012 em: http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2006/VIRAL/O_30-02.pdf?LA=1.

Charreyre C., Bésème S., Brun A., Bublot M., Lapostolle B., Sierra P. & Vaganay A. (2006b). PMWS protection of pigs born to sows vaccinated with as inactivated PCV2 vaccine under field conditions [versão electrónica]. In *Proceedings of the 19th IPVS Congress, 16-19 July, Copenhagen, Denmark*, p.107. Acedido em Abr. 26, 2012 em: http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2006/VIRAL/P_07-08.pdf?LA=1.

Cheung A., Lager K., Gauger P., Vincent A. & Opriessnig T. (2007). Comparison of the pathogenicity of porcine circovirus type 2 group 1 and group 2 isolates. In *Proceedings of the 5th International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases, 24-27 June, Krakow, Poland*, p. 273. Acedido em Jan. 26, 2012 em: http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=208757

Chevalier M., Fischer L. & Joisel F. (2010). Immediate efficacy of Circovac® (Merial) administered to 3 week-old SPF piglets against a challenge at 5 weeks of age [versão electrónica]. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, p.437. Acedido em Abr. 26, 2012 em: <http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2010/p2.pdf>.

Cino-Ozuna A.G., Henry S., Hesse R., Nietfeld J.C., Bai J., Scott H.M. & Rowland R.R.R. (2011). Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 2012-2016.

- Colditz I.G. (2002). Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. *Livestock Production Science*, 75, 257-268.
- Corregé I., Pirouelle H., Gaudré D. & Le Tiran M. (2001). La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) : influence de différents paramètres zootechniques sur son incidence dans un élevage expérimental. *Journées de la Recherche Porcine en France*, 33, 283-290.
- Cortey M., Olvera A., Grau-Roma L. & Segalés J. (2011). Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Veterinary Microbiology*, 149, 522-523.
- Darwich L., Pié S., Rovira A., Segalés J., Domingo M., Oswald I.P. & Mateu E. (2003a). Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of General Virology*, 84, 2117-2125.
- Darwich L., Balasch M., Plana-Durán J., Segalés J., Domingo M. & Mateu E. (2003b). Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *Journal of General Virology*, 84, 3453-3457.
- Darwich L., Segalés J. & Mateu E. (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Archives of Virology*, 149, 857-874.
- Darwich L., Segalés J., Resendes A., Balasch M., Plana-Durán J. & Mateu E. (2008). Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Research in Veterinary Science*, 84, 194-198.
- Darwich L. & Mateu E. (2011). Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, 164(1-2), 61-67.
- De Groot J., Ruis M.A.W., Scholten J.W., Koolhaas J.M. & Boersma W.J.A. (2001). Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. *Physiology & Behavior*, 73, 145-158.
- Department for Environment Food and Rural Affairs. *Summary profile for post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*. Acedido em Jan. 9, 2012, disponível em: <http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/vetsurveillance/profiles/documents/sp-pmws.pdf>.
- Dewey C., Vilaca K., Reidl M., De Grau F., Richardson K. & Poljak Z. (2010). Why viremia matters to swine practitioners. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, p.282.
- Dupont K., Nielsen E.O., Bækbo P. & Larsen L.E. (2008). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology*, 128, 56-64.
- Eggen A. (2010). Why viraemia matters: the PCV2 debate continues. *Pig Progress*, 26(5), 18-19.
- Eggen A., Schmidt U., Raes M. & Witvliet M. (2010). One-dose vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, p.110.

- Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S. & Allan G.M. (2004). Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*, 98, 159-163.
- European Medicines Agency (2007). *Concept paper on the need for requiring data to demonstrate the influence of maternally derived antibodies on the vaccination of very young animals*. Acedido em Mai. 3, 2012, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004556.pdf.
- European Medicines Agency (2009). *Porcilis PCV: EPAR - Scientific Discussion*. Acedido em Abr. 29, 2012, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/000135/WC500061520.pdf.
- European Medicines Agency (2010a). *Porcilis PCV: EPAR - Product Information*. Acedido em Abr. 29, 2012, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000135/WC500061523.pdf.
- European Medicines Agency (2010b). *Reflection paper on the demonstration of a possible impact of maternally derived antibodies on vaccine efficacy in young animals*. Acedido em Abr. 2, 2012, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500076626.pdf.
- European Medicines Agency (2011a). *Circovac: EPAR - Product Information*. Acedido em Abr. 29, 2012, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000114/WC500061517.pdf.
- European Medicines Agency (2011b). *Ingelvac CircoFLEX: EPAR - Product Information*. Acedido em Abr. 29, 2012, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000126/WC500062388.pdf.
- European Union Consortium on PCVD Research (2005). *PMWS case definition (Herd level)*. Acedido em Nov. 6, 2011, disponível em: http://www.porcilis-pcv.com/documents/Final_pmws_case_definition_EU_October_2005.pdf.
- Farreres J., Puig D., Menjon R., Bollo J., López J.V. & Jiménez M. (2010). Serology and safety of the simultaneous use of Porcilis® PCV and M+PAC® in the field. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, p. 408.
- Faurez F., Dory D., Grasland B. & Jestin A. (2009). Replication of porcine circoviruses. *Virology Journal*, 6:60.
- Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Elvinger F. & Meng X.J. (2004a). Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *Journal of Virology*, 78(24), 13440-13446.
- Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Elvinger F. & Meng X.J. (2004b). A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*, 78, 6297-6303.

- Finsterbusch T. & Mankertz A. (2009). Porcine circoviruses - small but powerful. *Virus Research*, 143, 177-183.
- Fort M., Olvera A., Sibila M., Segalés J. & Mateu E. (2007). Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Veterinary Microbiology*, 125, 244-255.
- Fort M., Sibila M., Allepuz A., Mateu E., Roerink F. & Segalés J. (2008). Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine*, 26, 1063-1071.
- Fort M. (2009). *Characterization of immune responses to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection and vaccination in pigs*. Ph.D. Thesis. Bellaterra: Centre de Recerca en Sanitat Animal, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Fort M., Fernandes L.T., Nofrarias M., Díaz I., Sibila M., Pujols J., Mateu E. & Segalés J. (2009a). Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129, 101-107.
- Fort M., Sibila M., Pérez-Martin E., Nofrarias M., Mateu E. & Segalés J. (2009b). One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine*, 27, 4031-4037.
- Fossum C. (2010). Porcine circovirus type 2: success and failure. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, pp. 20-24.
- Fraile L., Grau-Roma L., Sarasola P., Sinovas N., Nofrarias M., López-Jimenez R., López-Soria S., Sibila M. & Segalés J. (2012). Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine*, 30, 1986-1992.
- Gillespie J., Opriessnig T., Meng X. J., Pelzer K. & Buechner-Maxwell V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 1151-1163.
- Goubier A., Chapat L., Toma S., Piras F., Joisel F., Maurin-Bernaud L., Charreyre C., Andreoni C. & Juillard V. (2008). Transfer of maternal immunity from sows vaccinated against PCV2 with Circovac® to their piglets [versão electrónica]. In *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress, 22-26 June, Durban, South Africa*. Acedido em Abr. 26, 2012 em: <http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2008/oral/OR.01.16.pdf?LA=1>.
- Grau-Roma L., Crisci E., Sibila M., López-Soria S., Nofrarias M., Cortey M., Fraile L., Olvera A. & Segalés J. (2008). A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology*, 128, 23-35.
- Grau-Roma L., Hjulsgaard C., Sibila M., Kristensen C.S., López-Soria S., Enøe C., Casal J., Bøtner A., Nofrarias M., Bille-Hansen V., Fraile L., Baekbo P., Segalés J. & Larsen L.E. (2009). Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Veterinary Microbiology*, 135, 272-282.

- Grau-Roma L., Fraile L. & Segalés J. (2011). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *The Veterinary Journal*, 187, 23-32.
- Ha Y., Lee Y.H., Ahn K.K., Kim B. & Chae C. (2008). Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Veterinary Pathology*, 45, 842-848.
- Ha Y., Ahn K.K., Kim B., Cho K.D., Lee B.H., Oh Y.S, Kim S.H & Chae C. (2009). Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. *Research in Veterinary Science*, 86, 108-110.
- Hardge T., Gaumann H., Hasberg W. & Lange S. (2003). The economic impact of PMWS in the nursery - review of a successful control program. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 29 June - 2 July 2003, Rome, Italy*, pp. 203-204.
- Harding J.C.S., Clark E.G., Strokappe J.H., Willson P.I. & Ellis J.A. (1998). Postweaning multisystemic syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health and Production*, 6(6), 249-254.
- Harding J.C.S. (2004). The clinical expression and emergence of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*, 98, 131-135.
- Harding J. (2008). PCVD - Historical perspective and successful control [versão electrónica]. In *Proceedings of the Boehringer Ingelheim Satellite Symposium IPVS, 24 June, Durban, South Africa*, pp. 6-9. Acedido em Nov. 24, 2012 em: <http://www.bivkorea.com/proceedings/Harding.pdf>.
- Hayes S., Gamage L.N. & Hayes C. (2010). Dual expression system for assembling phage lambda display particle (LDP) vaccine to porcine circovirus type 2 (PCV2) [abstract]. *Vaccine*, 28(41), 6789-6799. Acedido em Mai. 20, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20674873>.
- Heegaard P.M.H., Dedieu L., Johnson N., Le Potier M.F., Mockey M., Mutinelli F., Vahlenkamp T., Vascellari M. & Sørensen N.S. (2011). Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Archives of Virology*, 156, 183-202.
- Henriques A.M., Duarte M., Fagulha T., Ramos F., Barros S.C., Luís T. & Fevereiro M. (2011). Molecular study of porcine circovirus type 2 circulating in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 2162-2172.
- Hesse R., Kerrigan M. & Rowland R.R.R. (2008). Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Research*, 132, 201-207.
- Hoogland M.J., Opriessnig T. & Halbur P.G. (2006). Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Journal of Swine Health and Production*, 14(3), 133-139.
- Huang Y.L., Pang V.F., Lin C.M., Tsai Y.C., Chia M.Y., Deng M.C., Chang C.Y. & Jeng C.R. (2011). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection decreases the efficacy of an attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine. *Veterinary Research*, 42(1):115.

- Intervet Schering-Plough Animal Health (2009). *Porcilis PCV - Keep protection on track from start to finish*. The Netherlands.
- Iowa State University College of Veterinary Medicine (2012). *Porcine circovirus type 2*. Acedido em Jan. 30, 2012, disponível em: <http://vetmed.iastate.edu/research/labs/pcv2>.
- Jacobsen B., Krueger L., Seeliger F., Bruegmann M., Segalés J. & Baumgaertner W. (2009). Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Veterinary Microbiology*, 138, 27-33.
- Jaros P., McIntyre L.H., Morris R.S., Johnstone A.C., Garkavenko O. & Neumann E. (2006). Experimental evidence that an agent other than PCV2 is a necessary cause of PMWS [versão electrónica]. In *Proceedings of the 19th IPVS Congress, 16-19 June 2006, Copenhagen, Denmark*, p. 168. Acedido em Fev. 9, 2012 em: http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2006/VIRAL/O_28-04.pdf?LA=1.
- Joisel F., Brune A., Schade A., Longo S. & Charreyre C. (2008). Improvement of reproduction performance induced by PCV2 vaccination of sows and gilts with Circovac® in 277 german sow farms [versão electrónica]. In *Proceedings of the 20th IPVS Congress, 22-26 June, Durban, South Africa*. Acedido em Abr. 26, 2012 em: <http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2008/posters/P01.072.pdf?LA=1>.
- Kane E.M., Potter M.L., Bergstrom J.R., Dritz S.S., Tokach M.D., DeRouchey J.M., Goodband R.D. & Nelssen J.L. (2008). Effects of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination timing and starter diet source on growth performance of nursery pigs. *2008 Swine Day Report of Progress 1001, Kansas State University, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service*, 14-20. Acedido em Nov. 28, 2011, disponível em: <http://www.ksre.ksu.edu/library/crpsl2/srp1001.pdf>.
- Karuppannan A.K., Jong M.H., Lee S.H., Zhu Y., Selvaraj M., Lau J., Jia Q. & Kwang J. (2009). Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology*, 383, 338-347.
- Kekarainen T., Montoya M., Mateu E. & Segalés J. (2008). Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *Journal of General Virology*, 89, 760-765.
- Kekarainen T., McCullough K., Fort M., Fossum C., Segalés J. & Allan G.M. (2010). Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type 2. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136, 185-193.
- Kennedy S., Segalés J., Rovira A., Scholes S., Domingo M., Moffett D., Meehan B., O'Neill R., McNeilly F. & Allan G. (2003). Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, 151-156.
- Kick A.R., Tompkins M.B. & Almond G.W. (2011). Stress and immunity in the pig. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6(18).
- Kick A.R., Tompkins M.B., Flowers W.L., Whisnant C.S. & Almond G.W. (2012). Effects of stress associated with weaning on the adaptative immune system in pigs. *Journal of Animal Science*, 90, 649-656.

- Kim J. & Chae C. (2004). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 in porcine circovirus 2-induced granulomatous inflammation. *Journal of Comparative Pathology*, 131, 121-126.
- Kim T., Toan N.T., Seo J., Jung B., Lee J. & Lee B. (2009). Bordetella bronchiseptica aroA mutant as a live vaccine vehicle for heterologous porcine circovirus type 2 major capsid protein expression [abstract]. *Veterinary Microbiology*, 138, 318-324. Acedido em Mai. 20, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428194>.
- Kim D., Ha Y., Oh Y. & Chae C. (2011). Prevalence of porcine circovirus types 2a and b in pigs with and without post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *The Veterinary Journal*, 188, 115-117.
- Kixmöller M., Ritzmann M., Eddicks M., Saalmüller A., Elbers K. & Fachinger V. (2008). Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*, 26, 3443-3451.
- Krakowka S., Ellis J.A., McNeilly F., Ringler S., Rings D.M. & Allan G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2). *Veterinary Pathology*, 38, 31-42.
- Krakowka S., Ellis J., McNeilly F., Waldner C. & Allan G. (2005). Features of porcine circovirus-2 disease: correlation between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 213-222.
- Kristensen C.S., Bille-Hansen V., Vigre H., Bøtner A., Bækbo P., Enøe C. & Larsen L.E. (2006). Transmission of PMWS between pen mates [versão electrónica]. In *Proceedings of the 19th IPVS Congress, 16-19 June, Copenhagen, Denmark*, p. 162. Acedido em Fev. 19, 2012 em: http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2006/VIRAL/O_27-02.pdf?LA=1.
- Kristensen C.S., Bækbo P., Bille-Hansen V., Bøtner A., Vigre H., Enøe C. & Larsen L.E. (2009). Induction of porcine postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs from PMWS unaffected herds following mingling with pigs from PMWS affected herds. *Veterinary Microbiology*, 138 (3-4), 244-250.
- Kristensen C.S., Baadsgaard N.P. & Toft N. (2011). A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. *Preventive Veterinary Medicine*, 98, 250-258.
- Kuehn T., Sondermeijer P., Eggen A., Fiebig K. & Von Rueden S. (2011). Development of a new marker ELISA (Bacucheck™) for compliance testing following the vaccination of piglets against PCV-2. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 12-15 June, Barcelona, Spain*, p. 42.
- Kurmann J., Sydler T., Brugnera E., Buergi E., Haessig M., Suter M. & Sidler X. (2011). Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(10), 1644-1649.
- Ladinig A., Von Rueden S., Ritzmann M., Fiebig K., Sondermeijer P., Eggen A. & Kuehn T. (2011). Use of the new Bacucheck™ ELISA to differentiate between PCV2-vaccinated and unvaccinated pigs of different ages. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 12-15 June, Barcelona, Spain*, p. 42.

- Langohr I.M., Stevenson G.W., Nelson E.A., Lenz S.D., HogenEsch H., Wei H. & Pogradichniy R.M. (2010). Vascular lesions in pigs experimentally infected with porcine circovirus type 2 serogroup B. *Veterinary Pathology*, 47, 140-147.
- Laza C., López J.V., Bollo J.M., Menjon R. & Jiménez M. (2011). Effect of Porcilis® PCV vaccination on production and economic parameters on a subclinically infected farm [versão electrónica]. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 12-15 June, Barcelona, Spain*, p.176. Acedido em Abr. 26, 2012 em: <http://ddd.uab.cat/pub/artpub/2011/77183/symposium.pdf>.
- Leblanc R., Morin M. & Messier S. (2005). L'impact économique du SDPS. *Porc Québec*, 52.
- Lin W., Chien M., Wu P., Lai C. & Huang C. (2011). The porcine circovirus type 2 nonstructural protein ORF3 induces apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells. *The Open Virology Journal*, 5, 148-153.
- Liu J., Chen I. & Kwang J. (2005). Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*, 79(13), 8262-8274.
- Lopes J.A.C. (2009). *Estudo de circovirose em explorações intensivas de suínos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- López-Soria S., Segalés J., Rose N., Viñas M.J., Blanchard P., Madec F., Jestin A., Casal J. & Domingo M. (2005). An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 69, 97-107.
- López-Soria S., Grau-Roma L. & Segalés J. (2008). Epidemiología de la circovirosis porcina. *Suís*, 49, 14-23.
- López-Soria S., Nofrarías M., Calsamiglia M., Espinal A., Valero O., Ramírez-Mendoza H., Mínguez A., Serrano J.M., Marín O., Callén A. & Segalés J. (2011). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) clinical expression under field conditions is modulated by the pig genetic background. *Veterinary Microbiology*, 149, 352-357.
- Lyoo K.S., Joo H.S., Caldwell B. & Davies P. (2010). Comparison of PCV2 viremia between heavy and light weight pigs at marketing age in farms with routine PCV2 vaccination. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, p.106. Acedido em Abr. 28, 2012 em: <http://www.avis.org/proceedings/ipvs/2010/o13.pdf#nameddest=65>.
- MacLachlan N.J. & Dubovi E.J. (2011a). Pathogenesis of viral infections and diseases. In N.J. MacLachlan & E.J. Dubovi (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology* (4th ed.).(pp. 43-74). London: Elsevier.
- MacLachlan N.J. & Dubovi E.J. (2011b). Antiviral immunity and prophylaxis. In N.J. MacLachlan & E.J. Dubovi (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology* (4th ed.).(pp. 75-99). London: Elsevier.
- Madec F., Eveno E., Morvan H., Hamon L., Blanchard P., Cariolet R., Amenna N., Morvan H., Truong C., Mahé D., Albina E. & Jestin A. (2000). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science*, 63, 223-233.

- Madson D.M., Ramamoorthy S., Kuster C., Pal N., Meng X., Halbur P.G. & Opriessnig T. (2008). Characterization of shedding patterns of porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 725-734.
- Madson D.M., Ramamoorthy S., Kuster C., Pal N., Meng X., Halbur P.G. & Opriessnig T. (2009a). Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Veterinary Research*, 40(1):10.
- Madson D.M., Patterson A.R., Ramamoorthy S., Pal N., Meng X.J. & Opriessnig T. (2009b). Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*, 46, 707-716.
- Madson D.M., Patterson A.R., Ramamoorthy S., Pal N., Meng X.J. & Opriessnig T. (2009c). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of the dam on PCV2 replication in utero. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(6), 830-834.
- Marco E. (2009). *Circovirosis porcina, un enfoque práctico*. Acedido em Abr. 24, 2012, disponível em: <http://www.seporlorca.com/pdf/ponencias09/ENRIC-MARCO.pdf>.
- Martelli P., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Bonilauri P., Guazzetti S., Caleffi A. & Borghetti P. (2011). One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Veterinary Microbiology*, 149, 339-351.
- Martineau G.P. & Morvan H. (2010). Le PCAD - Les pathologies associées au PCV2. In *Maladies d'élevage des porcs*. (pp. 24-27). Paris : Éditions France Agricole.
- Martinod S. (1995). Risk assessment related to veterinary biologicals: side-effects in target animals. *Revue Scientifique et Technique: Office International des Épizooties*, 14(4), 979-989.
- Mateusen B., Sanchez R.E., Van Soom A., Meerts P., Maes D.G.D. & Nauwynck H.J. (2004). Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection. *Theriogenology*, 61, 91-101.
- Mavromichalis I., Parr T.M. & Baker D.H. (2000). *Side-effects of vaccinations in nursery pigs*. Acedido em Mai. 18, 2012, disponível em: <http://www.livestocktrail.illinois.edu/porknet/paperDisplay.cfm?ContentID=101>.
- McCullough K.C., Ruggli N. & Summerfield A. (2009). Dendritic cells - at the front-line of pathogen attack. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 7-15.
- McKeown N.E., Opriessnig T., Thomas P., Guenette D.K., Elvinger F., Fenaux M., Halbur P.G. & Meng X.J. (2005). Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12(11), 1347-1351.
- Meehan B., McNeilly F., Todd D., Kennedy S., Jewhurst V., Ellis J., Hassard L., Clark E., Haines D. & Allan G. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndrome in pigs. *Journal of General Virology*, 79, 2171-2179.
- Meerts P. (2005). *The complex interaction between porcine circovirus type 2 and the pig's immune system*. Ph.D. Thesis. Gent: Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent.

- Meerts P., Van Gucht S., Cox E., Vandebosch A. & Nauwynck H.J. (2005). Correlation between type of adaptative response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunology*, 18, 333-341.
- Meerts P., Misinzo G., Lefebvre D., Nielsen J., Bøtner A., Kristensen C.S. & Nauwynck H.J. (2006). Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Veterinary Research*, 2, 6-11.
- Meeusen E.N.T., Walker J., Peters A., Pastoret P.P. & Jungersen G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 489-510.
- Merial (2006). White Book Series: *PCVD...Coming full circle* (6th ed.). Lyon: Merial.
- Modi C.M., Mody S.K., Patel H.B., Dudhatra G.B., Kumar A. & Sheikh T.J. (2011). Growth promoting use of antimicrobial agents in animals. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(8), 33-36.
- Moon H.K., Han I.K., Gentry J.L., Parmentier H.K. & Schrama J.W. (1999). Effects of chronic inflammation on energy metabolism and growth performance in weanling piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12(2), 174-179.
- MSD Santé Animale (2011). *Avec le BacuCheck® ELISA testez la qualité de votre vaccination Porcilis® PCV*. France.
- Oh Y., Seo H.W., Han K., Park C. & Chae C. (2012). Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge [abstract]. *Journal of General Virology*, doi: 10.1099/vir.0.041749-0.
- Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J. & Domingo M. (2004). Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods*, 117, 75-80.
- O'Neill K.C., Shen H.G., Lin K., Hemann M., Beach N.M., Meng X.J., Halbur P.G. & Opriessnig T. (2011). Studies on porcine circovirus type 2 vaccination of 5-day-old piglets. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11), 1865-1871.
- Opriessnig T., Yu S., Thacker E.L. & Halbur P.G. (2004). Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *Journal of Swine Health and Production*, 12(4), 186-191.
- Opriessnig T., McKeown N.E., Harmon K.L., Meng X.J. & Halbur P.G. (2006a). Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(8), 923-929.
- Opriessnig T., Fenaux M., Thomas P., Hoogland M.J., Rothschild M.F., Meng X.J. & Halbur P.G. (2006b). Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Veterinary Pathology*, 43, 281-293.
- Opriessnig T., Halbur P.G., Yu S., Thacker E.L., Fenaux M. & Meng X.J. (2006c). Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *The Veterinary Record*, 158, 149-154.

- Opriessnig T., Janke B.H. & Halbur P.G. (2006d). Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. *Journal of Comparative Pathology*, 134, 105-110.
- Opriessnig T., Meng X.J. & Halbur P.G. (2007). Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 591-615.
- Opriessnig T., Ramamoorthy S., Madson D.M., Patterson A.R., Pal N., Carman S., Meng X.J. & Halbur P.G. (2008a). Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *Journal of General Virology*, 89, 2482-2491.
- Opriessnig T., Ramamoorthy S., Madson D.M., Patterson A.R., Meng X.J. & Halbur P.G. (2008b). Experimental characterization of PCV2a and PCV2b isolates in a conventional pig model and evaluation of cross-protection between strains. In *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians, 39th Annual Meeting, 8-11 March, San Diego, California, USA*, pp.119-120.
- Opriessnig T., Patterson A.R., Elsener J., Meng X.J. & Halbur P.G. (2008c). Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(3), 397-401.
- Opriessnig T., Madson D.M., Prickett J.R., Kuhar D., Lunney J.K., Elsener J. & Halbur P.G. (2008d). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Veterinary Microbiology*, 131, 103-114.
- Opriessnig T., Patterson A.R., Meng X.J. & Halbur P.G. (2009a). Porcine circovirus type 2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naïve pigs by oral consumption. *Veterinary Microbiology*, 133, 54-64.
- Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N., Rothschild M., Kuhar D., Lunney K., Juhan N.M., Meng X.J. & Halbur P.G. (2009b). Difference in severity of porcine circovirus type 2 (PCV2)-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *Journal of Animal Science*, 87, 1582-1590.
- Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N. & Halbur P.G. (2009c). Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3 months post vaccination. *Vaccine*, 27, 1002-1007.
- Opriessnig T., Madson D.M., Schalk S., Brockmeier S., Shen H.G., Beach N.M., Meng X.J., Baker R.B., Zanella E.L. & Halbur P.G. (2011). Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination is effective in reducing disease and PCV2 shedding in semen of boars concurrently infected with PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Theriogenology*, 76, 351-360.
- Opriessnig T. & Halbur P.G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Research*, 164, 20-32.
- Pallarés F.J., Halbur P.G., Opriessnig T., Sorden S.D., Villar D., Janke B.H., Yaeger M.J., Larson D.J., Schwartz K.J., Yoon K.J. & Hoffman L.J. (2002). Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 515-519.

- Palzer A., Rist B., Ritzmann M., Lang C., von Rüden S., Heinritzi K., Eggen A. & Smeets J. (2010). Efficacy against porcine circovirus type 2 of a single dose of Porcilis PCV given to MDA-positive piglets of either one or three weeks of age. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*.
- Park J.S., Ha Y., Kwon B., Cho K.D., Lee B.H. & Chae C. (2009). Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. *Journal of Comparative Pathology*, 140, 208-211.
- Parrish C.R. (2011). Circoviridae. In N.J. MacLachlan & E.J. Dubovi (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology* (4th ed.).(pp. 237-242). London: Elsevier.
- Patterson A.R., Ramamoorthy S., Madson D.M., Meng X.J., Halbur P.G. & Opriessnig T. (2011). Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Veterinary Microbiology*, 149, 91-98.
- Pejsak Z., Podgórska K., Truszczyński M., Karbowski P. & Stadejek T. (2010). Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33, e1-e5.
- Pfizer Animal Health Inc. (2011). *Fostera™ PCV*. Acedido em Abr. 29, 2012, disponível em: https://animalhealth.pfizer.com/sites/pahweb/US/EN/Products/pdf/FosteraPCV_ProductInformation_FINAL.pdf.
- Pluske J.R., Le Dividich J. & Hampson D.J. (2006). Nursery pig management. In Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S. & Taylor D.J. (Eds.), *Diseases of Swine* (6th ed.).(pp. 1039-1050). Ames: Blackwell Publishing.
- Pogranichniy R.M., Yoon K.J., Harms P.A., Sorden S.D. & Daniels M. (2002). Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 449-456.
- Potter M.L., Duttlinger A.W., Bergstrom J.R., Dritz S.S., DeRouchey J.M., Tokach M.D., Goodband R.D. & Nelssen J.L. (2009). Effects of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines on nursery pig performance. *2009 Swine Day Report of Progress 1020, Kansas State University, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service*, 21-27. Acedido em Nov. 28, 2011, disponível em: <http://www.ksre.ksu.edu/library/lvstk2/srp1020.pdf>.
- Potter M.L. (2010). *Effect of circovirus vaccination on immune responses, viral load, and growth performance of pigs under field conditions*. Ph.D. Thesis. Manhattan: Department of Diagnostic Medicine/Pathobiology College of Veterinary Medicine, Kansas State University.
- Quintana J., Segalés J., Rosell C., Calsamiglia M., Rodríguez-Arriola G.M., Chianini F., Folch J.M., Maldonado J., Canal M., Plana-Durán J. & Domingo M. (2001). Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Veterinary Record*, 149, 357-361.
- Rodríguez-Arriola G.M., Segalés J., Calsamiglia M., Resendes A.R., Balasch M., Plana-Durán J., Casal J. & Domingo M. (2002). Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, 63(3), 354-357.

- Rose N., Larour G., Le Diguerher G., Eveno E., Jolly J.P., Blanchard P., Oger A., Le Dimna M., Jestin A. & Madec F. (2003). Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 61(3), 209-225.
- Rose N., Opriessnig T., Grasland B. & Jestin A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, 164(1-2), 78-89.
- Rosell C., Segalés J., Plana-Durán J., Balasch M., Rodríguez-Arrioja G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S. & Domingo M. (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 120, 59-78.
- Rueda F.G. (2011). La anorexia post-destete del lechón (I) : causas y consecuencias de la anorexia post-destete. *Anaporc : Revista de la Asociación de Porcinocultura Científica*, 76 (8), 24-28.
- Saha D., Lefebvre D.J., Ducatelle R., Doorselaere J.V. & Nauwynck H.J. (2011). Outcome of experimental porcine circovirus type 1 infections in mid-gestational porcine fetuses. *BMC Veterinary Research*, 7(64).
- Sanchez R.E., Nauwynck H.J., McNeilly F., Allan G.M. & Pensaert M.B. (2001). Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Veterinary Microbiology*, 83, 169-176.
- Sanchez R.E., Meerts P., Nauwynck H.J. & Pensaert M.B. (2003). Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Veterinary Microbiology*, 95, 15-25.
- Schinckel A.P., Clark K., Stevenson G., Knox K.E., Nielsen J., Grant A.L., Hancock D.L. & Turek J. (1995). Effects of antigenic challenge on growth and composition of segregated early-weaned pigs. *Swine Health and Production*, 3(6), 228-234.
- Segalés J., Pastor J., Cuenca R. & Domingo M. (2000). Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs. *The Veterinary Record*, 146, 675-676.
- Segalés J. (2002). Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *Journal of Swine Health and Production*, 10(6), 277-281.
- Segalés J. & Domingo M. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs: a review. *Veterinary Quarterly*, 24(3), 109-124.
- Segalés J., Rosell C. & Domingo M. (2004). Pathological findings with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary Microbiology*, 98, 137-149.
- Segalés J., Calsamiglia M., Olvera A., Sibila M., Badiella L. & Domingo M. (2005). Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, 111, 223-229.
- Segalés J., Allan G.M. & Domingo M. (2006). Porcine circovirus diseases. In Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S. & Taylor D.J. (Eds.), *Diseases of Swine* (6th ed.).(pp. 299-307). Ames: Blackwell Publishing.

- Segalés J. (2007). Porcine circovirus disease (PCVD) - have we won the war in Europe? *Advances in Pork Production*, 18, 49-56.
- Segalés, J., Larsen L., Wallgren P., Rose N., Grau-Roma L., Sibila M., Fraile L., Casal J. & Bækbo P. (2007). What do we know on epidemiology, control and prevention of porcine circovirus diseases? In *Proceedings of the 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 24-27 June, Krakow, Poland*, pp. 35-38.
- Segalés J. (2008). *Circovirus - history and controversy of disease*. Acedido em Jan. 14, 2012, disponível em: http://www.pig333.com/circovirosis/history-and-controversy-of-disease_73/.
- Segalés J., Urniza A., Alegre A., Bru T., Crisci E., Nofrarías M., López-Soria S., Balasch M., Sibila M., Xu Z., Chu H.J., Fraile L. & Plana-Duran J. (2009). A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine*, 27, 7313-7321.
- Segalés J. & Cortey M. (2010). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) age-shift presentation is not supported by an 11-year retrospective study in Spain [versão electrónica]. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, p.286. Acedido em Abr. 24, 2012 em: <http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2010/o44.pdf#nameddest=245>.
- Segalés J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*, 164, 10-19.
- Shen H.G., Beach N.M., Huang Y.W., Halbur P.G., Meng X.J. & Opriessnig T. (2010). Comparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV). *Vaccine*, 28, 5960-5966.
- Shen H.G., Halbur P.G. & Opriessnig T. (2012). Prevalence and phylogenetic analysis of the current PCV2 genotypes after implementation of widespread vaccination programs in the United States [abstract]. *Journal of General Virology*, 93(6), 1345-1355. Acedido em Mai. 20, 2012, disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/content/early/2012/03/02/vir.0.039552-0.abstract>.
- Shi K.C., Guo X., Ge X.N., Liu Q., Yang H.C. (2010). Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*, 140, 155-160.
- Shibata I., Okuda Y., Kitajima K. & Asai T. (2006). Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *Journal of Veterinary Medicine*, 53, 278-280.
- Sialelli J. N. (2011, Abril). Les maladies subcliniques coûtent 3 à 8€ par porc. *Réussir Porcs*, 181, p.39.
- Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J., Blanchard P., Badiella L., Le Dimna M., Jestin A. & Domingo M. (2004). Use of polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, 65, 88-92.
- Sidler X., Kurmann J., Buergi E., Brugnera E. & Sydler T. (2010). Economic impact of Circovac® in a PCV2 subclinically infected breeding farm in Switzerland [versão

electrónica]. In *Proceedings of the 21st IPVS Congress, 18-21 July, Vancouver, Canada*, p.405. Acedido em Abr. 26, 2012 em: <http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2010/p2.pdf>.

- Sinha A., Shen H.G., Schalk S., Beach N.M., Huang Y.W., Halbur P.G., Meng X.J. & Opriessnig T. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection at the time of porcine circovirus type 2 vaccination has no impact on vaccine efficacy. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(2), 1940-1945.
- Sorden S.D. (2000). Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health and Production*, 8(3), 133-136.
- Sotillo A.Q. & Méndez M.L.H. (2007). Comportamiento agonístico: mezcla de lotes. In Sotillo A.Q. & Méndez M.L.H., *Cría y manejo del lechón*. (pp. 201-212). Madrid, Spain: Acalanthis.
- Steiner E., Balmelli C., Herrmann B., Summerfield A. & McCullough (2008). Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, 378, 311-322.
- Summerfield A. (2009). The immunology of PCV2 diseases. *Porcils PCV - Keep protection on track from start to finish*, 4-7.
- Summerfield A. & McCullough K.C. (2009). The porcine dendritic cell family. *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 299-309.
- Synbiotics Europe SAS (2010). *SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking*. Lyon: Synbiotics.
- Tizard I. (2004). Immunity in the fetus and newborn. In Tizard I. (Ed.), *Veterinary immunology: an introduction* (7th ed.). (pp. 221-232). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Todd D. (2004). Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology*, 98, 169-174.
- Tokach M.D., Goodband R.D., Nelssen J.L. & Kats L.J. (1992). Influence of weaning weight and growth during the first week postweaning on subsequent pig performance. *1992 Swine Day Report of Progress 667, Kansas State University, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service*, 15-17. Acedido em Nov. 28, 2011, disponível em: <http://www.ksre.ksu.edu/library/lvstk2/srp667.pdf>.
- Tomás A., Fernandes L.T., Valero O. & Segalés J. (2008). A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, 132, 260-273.
- Trible B.R. & Rowland R.R.R. (2012). Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Research*, 164 (1-2), 68-77.
- Trible B. R., Ramirez A., Suddith A., Fuller A., Kerrigan M., Hesse R., Nietfeld J., Guo B., Thacker E. & Rowland R.R.R. (2012). Antibody responses following vaccination versus infection in a porcine circovirus-type 2 (PCV2) disease model show distinct differences in virus neutralization and epitope recognition. *Vaccine*, 30, 4079-4085.
- Tucker A.W. & Donadeu M. (2006). *Porcine multi-systemic wasting syndrome (PMWS): a review*. Acedido em Fev. 5, 2012, disponível em: <http://www.thepigsite.com/articles/1630/porcine-multisystemic-wasting-syndrome-pmws-a-review>.

- Venegas-Vargas M.C., Bates R., Morrison R., Villani D. & Straw B. (2011). Effect of porcine circovirus type 2 vaccine on postweaning performance and carcass composition. *Journal of Swine Health and Production*, 19(4), 233-237.
- Vicente J., Segalés J., Höfle U., Balasch M., Plana-Durán J., Domingo M. & Gortázar (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Research*, 35, 243-253.
- Vincent I.E., Carrasco C.P., Herrmann B., Meehan B.M., Allan G.M., Summerfield A. & McCullough K.C. (2003). Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *Journal of Virology*, 77(24), 13288-13300.
- Vincent I.E., Carrasco C.P., Guzylack-Pirou L. Herrman B., McNeilly F., Allan G.M., Summerfield A. & McCullough K.C. (2005). Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology*, 115, 388-398.
- Vincent I.E., Balmelli C., Meehan B., Allan G., Summerfield A. & McCullough K.C. (2007). Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology*, 120, 47-56.
- Wang X. Jiang P., Li Y., Jiang W. & Dong X. (2007). Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*, 121, 215-224.
- West K.H., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shantz N., Jacobson M., Allan G.M., Haines D.M., Clark E.G., Krakowka S., McNeilly F., Konoby C. Martin K. & Ellis J.A. (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 530-532.
- Williams I.H. (2003). Growth of the weaned pig. In Pluske J.R., Le Dividich J. & Verstegen M.W.A. (Eds.), *Weaning the pig: concepts and consequences*. (pp. 17-35). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Yu S., Opriessnig T., Kitikoon P., Nilubol D., Halbur P.G. & Thacker E. (2007). Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115, 261-272.
- Zhai S.L., Chen S.N., Wei Z.Z., Zhang J.W., Huang L., Lin T., Yue C., Ran D.L., Yuan S.S., Wei W.K. & Long J.X. (2011). Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virology Journal*, 8:517.

Anexos

- **Anexo 1** - Comparação das médias de temperatura rectal de animais vacinados e não vacinados

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: Temperatura by Grupo

W = 767, p-value < 2.2e-16

alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

- **Anexo 2** - Comparação da morbilidade e da mortalidade entre grupos experimentais

> MORBILIDADE

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 32.3581, df = 1, p-value = 1.282e-08

> MORTALIDADE

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 2.0825, df = 1, p-value = 0.149

- **Anexo 3** - Comparação dos pesos iniciais entre grupos experimentais

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: Peso.dia.0..kg. by Pre.Pos

W = 24757, p-value = 0.5738

alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

- **Anexo 4** - Comparação dos pesos finais e do ganho médio diário entre grupos experimentais (global)

The GLM Procedure

Least Squares Means

trat	gmd LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr > t	H0:LSMean1= LSMean2 Pr > t
a	0.31136861	0.00483229	<.0001	0.0090
b	0.29248673	0.00558202	<.0001	

trat	pfinal45 LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr > t	H0:LSMean1= LSMean2 Pr > t
a	19.9701972	0.2174222	<.0001	0.0089
b	19.1198838	0.2511550	<.0001	

- **Anexo 5** - Comparação do peso final à saída da recria e do ganho médio diário entre os dois desmames do grupo experimental A

The GLM Procedure Least Squares Means				
bloco	gmd LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr > t	H0:LSMean1= LSMean2 Pr > t
1	0.31204392	0.00804040	<.0001	0.6945
2	0.31629656	0.00731693	<.0001	

bloco	pfina145 LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr > t	H0:LSMean1= LSMean2 Pr > t
1	20.1006543	0.3618179	<.0001	0.6945
2	20.2920229	0.3292617	<.0001	

- **Anexo 6** - Comparação do peso final à saída da recria e do ganho médio diário entre os animais do segundo desmame pertencentes aos grupos experimentais A e B

Estimates

Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
tratA-tratB	1.0488	0.4427	86	2.37	0.0201

Least Squares Means						
Effect	trat	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
trat	a	19.9671	0.2868	86	69.63	<.0001
trat	b	18.9184	0.3434	86	55.09	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	trat	_trat	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
trat	a	b	1.0488	0.4427	86	2.37	0.0201

Estimates

Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
tratA-tratB	0.02329	0.009830	86	2.37	0.0201

Least Squares Means						
Effect	trat	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
trat	a	0.3118	0.006367	86	48.97	<.0001
trat	b	0.2885	0.007625	86	37.84	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	trat	_trat	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
trat	a	b	0.02329	0.009830	86	2.37	0.0201

• **Anexo 7** - Comparação dos parâmetros produtivos entre os animais do primeiro desmame pertencentes aos grupos experimentais A e B

Estimates

Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
tratA-tratB	0.01586	0.01054	79	1.50	0.1365

Least Squares Means

Effect	trat	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
trat	a	0.3046	0.007619	79	39.97	<.0001
trat	b	0.2887	0.008510	79	33.92	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	trat	_trat	Estimate	Standard Error	DF	t value	Pr > t
trat	a	b	0.01586	0.01054	79	1.50	0.1365

• **Anexo 8** - Associação entre o peso inicial do leitão e o número de barrigas da porca

The GLM Procedure

Least Squares Means

class B2	pinicial LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number
B	5.64826389	0.12401519	<.0001	1
M	6.12613095	0.12507790	<.0001	2
P	5.59773313	0.08246586	<.0001	3
V	6.42042125	0.12505348	<.0001	4

Least Squares Means for effect classB2
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent variable: pinicial

i/j	1	2	3	4
1		0.0074	0.7348	<.0001
2	0.0074		0.0005	0.0980
3	0.7348	0.0005		<.0001
4	<.0001	0.0980	<.0001	

	Primiparas	2ª e 3ª	4ª e 5ª	Mais de 6	P value
Peso inicial	5,60 ^a ±0,082	5,65 ^a ±0,124	6,13 ^b ±0,125	6,42 ^b ±0,125	<0,001